
Mechanische Kräfte regulieren die Bindungspromiskuität von $\alpha V \beta 3$ -Integrin

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte Dissertation

von

Markus Schäfer
aus Walldorf

Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Korreferent: Prof. Dr. Bernhard Wehrle-Haller

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2019

ERKLÄRUNG

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von Februar 2016 bis Juni 2019 am Zoologischen Institut, Zell- und Neurobiologie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) durchgeführt

Ich versichere hiermit, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hinweise benutzt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis habe ich in der gültigen Fassung beachtet. Diese Arbeit wurde in keiner Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich versichere außerdem, dass die beigelegte elektronische Version der Arbeit mit der schriftlichen übereinstimmt.

Markus Schäfer
Karlsruhe, den 30. August 2019

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	ix
Zusammenfassung	xiii
Tabellenverzeichnis	xii
1 Einleitung	1
1.1 Die Extrazelluläre Matrix	2
1.2 Die Integrin Rezeptorfamilie: Ein Rezeptor, mehrere Liganden	3
1.3 Promiskuität von $\alpha V\beta 3$ -Integrin: Vitronektin oder Fibronektin	4
1.4 Regulationsmöglichkeiten der Promiskuität	6
1.5 Zell-Matrix Adhäsionen: Von passiver Verankerung zum Signalknotenpunkt	7
1.6 Dynamik von Zell-Matrix Adhäsionen	7
1.7 Mechanosensing in Zell-Matrix Adhäsionen: Wenn Kräfte zu Signalen werden	9
1.8 Integrin Aktivierung: Ein Rezeptor, mehrere Konformationen	10
1.9 Intrazelluläre Regulation der Integrin-Aktivierung	13
1.10 Extrazelluläre Regulation der Integrin-Aktivierung	14
1.11 Zellkultursubstrate	16
1.12 Zielsetzung	18
2 Material und Methoden	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen	21
2.1.2 Plasmide, Antikörper und Affinitätsmarker	23
2.1.3 Proteine	24
2.1.4 Mikroskope, Objektive und Software	25
2.2 Substratherstellung	26
2.2.1 Homogen beschichtete Proteinsubstrate	26
2.2.2 Differenzielle Proteinsubstrate: Stempelmuster	27
2.2.3 Herstellung der Stempel	27
2.2.4 Reinigung der Stempel	28
2.2.5 Direktes Proteinstempeln	28
2.3 Zellkultur und Zellexperimente	29
2.3.1 Routine Zellkultur	30
2.3.2 Transfektion von Zellen: Lipofektion	30
2.3.3 Zellexperimente auf Proteinsubstraten	31
2.3.4 Zeitrafferaufnahmen	32
2.4 Immunhistochemie	32
2.5 Molekulardynamik (MD) Simulationen	32
2.6 Bio-Layer Interferometrie	33
2.6.1 BLItz Assay	34
2.7 Hochauflösende Mikroskopie	35

2.8	Bildbearbeitung und Quantifizierung	37
2.8.1	Quantifizierung auf homogen beschichteten Substraten	37
2.8.2	Quantifizierung auf differenziellen Substraten	37
2.9	Statistische Tests	39
3	Ergebnisse	41
3.1	α V β 3-Integrin zeigt hohe Selektivität für die Liganden Vitronektin und Osteopontin	42
3.1.1	Vitronektin aus dem Serum überlagert spezifisch beschichtete Protein-substrate	43
3.2	α V β 3-Integrin bindet auf differenziellen Proteinsubstraten bevorzugt an Vitronektin bzw. Osteopontin	45
3.3	α V β 3-Integrin bindet Vitronektin mit höherer Affinität als Fibronektin . . .	47
3.4	α V β 3-Integrin kann nur im maturierten Zustand an Fibronektin binden . . .	49
3.5	Verringerter mechanischer Zug auf α V β 3-Integrin führt zu reduzierter Fn-Bindung	50
3.5.1	DeNovo induzierte Integrin Cluster sind nicht mechanisch an Aktin gekoppelt und binden ausschließlich Vitronektin	53
3.6	MyosinIIA Überexpression erhöht die Lokalisation von α V β 3-Integrin auf Fibronektin	55
3.7	Ein konstitutiver Swing-out der Hybrid-Domäne erhöht die Lokalisation von α V β 3-Integrin auf Fibronektin	56
3.7.1	Ohne mechanische Kraft ist die Konformationsänderung in β 3-N305T nicht ausreichend für Fibronektin Bindung	59
3.7.2	Die Glykosylierung in β 3-N305T führt nicht zu maximaler Aktivierung	60
3.8	Integrin Inaktivierung durch Ca^{2+} reduziert die Lokalisation von α V β 3-Integrin auf Fibronektin	62
3.9	Eine Disulfidbrücke zwischen der β A-Domäne und der Hybrid-Domäne hält α V β 3-Integrin in der geschlossenen Konformation	63
3.10	α V β 3-Integrin in der EC-Konformation bindet ausschließlich an Vitronektin aber nicht an Fibronektin	65
3.10.1	β 3-V80C/D241C zeigt nach Mn^{2+} Aktivierung verstärkte Rekrutierung auf Vitronektin aber nicht auf Fibronektin	66
3.11	Das Aufbrechen von Disulfidbrücken ermöglicht die Bindung von β 3-V80C/D241C an Fibronektin	69
4	Diskussion	73
4.1	α V β 3-Integrin: “Der Vitronektin Rezeptor“?	74
4.1.1	Einfluss von Serumeffekten	75
4.1.2	α V β 3-Integrin bindet trotz aller Promiskuität bevorzugt an Vitronektin und Osteopontin	76
4.1.3	Biochemische Affinitätsmessungen: Vitronektin vs. Fibronektin	76
4.2	Fibronektin vs. Vitronektin Bindung: Regulation über mechanische Kräfte oder Signalproteine?	78
4.2.1	Mechanische Kräfte machen den Unterschied	79
4.3	Mechanische Kräfte kontrollieren die Konformation von α V β 3-Integrin . . .	82
4.3.1	α V β 3-Integrin in der EC-Konformation: Geschlossen aber aktiv für Vitronektin	82
4.3.2	α V β 3-Integrin in der EO-Konformation: die geöffnete Kopfgruppe ermöglicht Fibronektin Bindung	85

4.4	Struktur-Funktion-Beziehung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin: Aktiv bedeutet nicht gleich aktiv für jeden Liganden	86
4.5	Die konservierte RGD-Sequenz: Ein Erkennungsmotiv aber unterschiedliche Bindungsaffinitäten	88
4.6	Zelluläre Konsequenzen einer kraftabhängigen Ligandenbindung	91
4.6.1	Bindung löslicher Liganden vs. immobilisierter Liganden	91
4.6.2	Mechanische Kraft und fibrilläre Adhäsionen	92
5	Fazit und offene Fragen	95
	Abkürzungsverzeichnis	97
	Publikationen	99
	Literatur	103

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Komponenten der extrazellulären Matrix	2
1.2	Bindungspromiskuität von Integrinen	4
1.3	Bildung von Zell-Matrix Kontakten	8
1.4	Konformationsänderungen während der Integrin Aktivierung	11
1.5	Wie reguliert $\alpha V\beta 3$ -Integrin welcher Ligand gebunden wird?	19
2.1	Verfahren des direkten Proteinstempeln	29
2.2	Prinzip der Biolayer Interferometrie	34
2.3	Einzelschritte des BLItz Assay	35
2.4	Auflösungssteigerung durch SIM-Mikroskopie	36
2.5	Prinzip der Biolayer Interferometrie	38
3.1	$\alpha V\beta 3$ -Integrin-vermittelte Adhäsionsbildung auf unterschiedlichen Liganden.	43
3.2	ECM-Proteine aus dem Serum überlagern homogen beschichtete Proteinsubstrate.	44
3.3	Lokalisation von $\alpha V\beta 3$ -Integrin auf differenziellen Proteinsubstraten.	46
3.4	Biochemische Bindungsaffinität von $\alpha V\beta 3$ -Integrin für Fn bzw. Vn.	48
3.5	Bildung initialer Adhäsionen und Adhäsionsdynamik von $\alpha V\beta 3$ -Integrin auf Fn/Vn Substraten	50
3.6	Mechanische Kräfte regulieren die differenzielle Ligandenbindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin.	52
3.7	Integrin Aktivierung induziert zentrale Integrin Cluster, die ausschließlich Vn binden.	54
3.8	DeNovo induzierte Integrin Cluster können nur auf Vn gebildet werden aber nicht auf Fn.	54
3.9	Erhöhung zellulärer Kontraktilität erhöht die Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin an Fn.	56
3.10	Ein <i>Swing-out</i> der Hybrid Domäne ist notwendig für eine Fn-Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin.	58
3.11	$\beta 3$ -N305T-Integrin benötigt mechanische Kraft für effektive Fn-Bindung.	60
3.12	$\beta 3$ -N305T-Integrin ist nicht in der maximal aktivierten Konformation.	61
3.13	Integrin Inaktivierung mit Ca^{2+} reduziert Fn-Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin.	62
3.14	$\alpha V\beta 3$ -Integrin kann durch eine Disulfidbrücke in der EC-Konformation blockiert werden.	64
3.15	$\alpha V\beta 3$ -Integrin in der EC-Konformation bindet Vn aber nicht Fn.	66
3.16	$\alpha V\beta 3$ -Integrin in der EC-Konformation bindet nach Mn^{2+} Aktivierung ausschließlich an Vn aber nicht an Fn.	68
3.17	$\beta 3$ -V80C/D241C kann nach dem Aufbrechen von Disulfidbrücken eine Fn-Bindung eingehen.	70
3.18	Das Aufbrechen von Disulfidbrücken erhöht die Lokalisation von $\beta 3$ -V80C/D241C auf Fn.	72
4.1	Hypothetisches Model der differenziellen Ligandenbindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin.	90

TABELLENVERZEICHNIS

2.1	Verwendete Lösungsmittel, Chemikalien und andere Labormaterialien. . . .	21
2.2	Übersicht der verwendeten Medien, Puffer und Lösungen.	23
2.3	Übersicht der verwendeten Plasmide.	23
2.4	Verwendete Primärantikörper. Die eingesetzte Verdünnung erfolgt in 1 % BSA in PBS.	24
2.5	Verwendete Sekundärantikörper. Die eingesetzte Verdünnung erfolgt in 1 % BSA in PBS.	24
2.6	Verwendete Affinitätsmarker. Die eingesetzte Verdünnung erfolgt in 1 % BSA in PBS.	24
2.7	Liste verwendeter Proteine.	24
2.8	Übersicht der verwendeten Mikroskope und Objektive.	25
2.9	Übersicht der verwendeten Software.	26
2.10	Behandlung von Zellen mit pharmakologischen Inhibitoren bzw. zweiwertigen Kationen.	31

ZUSAMMENFASSUNG

Zellen in einem Gewebe kommunizieren mit der extrazellulären Matrix (ECM) über membranständige Rezeptoren wie z.B. Integrine. Dabei handelt es sich um Transmembranrezeptoren, die auf extrazellulärer Seite an Proteine der ECM binden und auf intrazellulärer Seite über einen Signal/Adapterkomplex indirekt an das Aktin-Zytoskelett gekoppelt sind. Ein solches Setup ermöglicht ein Kommunikationssystem mit bidirektionaler Signalweiterleitung. $\alpha V\beta 3$ -Integrin gehört zu den RGD-bindenden Integrinen und erkennt mindestens 12 verschiedene extrazelluläre Liganden. Im Gegensatz zu anderen Integrinen ergibt sich dadurch eine sehr hohe Promiskuität. In einer komplexen ECM-Umgebung liegen mehrere dieser Liganden von $\alpha V\beta 3$ -Integrin gleichzeitig und in unmittelbarer Nähe zueinander vor. Bis heute ist nicht geklärt wie dieses Integrin zwischen seinen Liganden “entscheidet“ und ob es Mechanismen gibt, die je nach zellulärer Situation regulieren welcher Ligand gebunden wird und welcher nicht.

In dieser Arbeit wurde die Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin an unterschiedliche Liganden mithilfe differenzieller Proteinsubstrate untersucht. Diese Art von Substrat präsentiert einer Zelle zwei Liganden gleichzeitig und in subzellulärer Auflösung. Damit kann eine Zelle “entscheiden“ auf welchem Liganden präferiert Integrin-vermittelte Adhäsionen gebildet werden. In den Zellexperimenten zeigte sich eine hohe Präferenz für die Liganden Vitronektin (Vn) und Osteopontin (Opn), während eine Adhäsionsbildung auf den Liganden Fibrinogen (Fbg), Fibronektin (Fn) und Thrombospondin (Tsp) klar vermieden wird. In Kombination mit biochemischen Affinitätsmessungen wurden Vn und Opn daher als Liganden mit hoher Affinität für $\alpha V\beta 3$ -Integrin eingestuft, während Fbg, Fn und Tsp mit vergleichsweise niedrigerer Affinität gebunden werden.

Aber wie “entscheidet“ dieses Integrin nun welcher Ligand gebunden wird und welcher nicht? Basierend auf experimentellen Daten wird am Beispiel der Liganden Fn und Vn ein Modell vorgeschlagen, in dem mechanische Kräfte die Bindungseigenschaften von $\alpha V\beta 3$ -Integrin regulieren. Wird die die Aktin/Myosin vermittelte Kontraktilität mittels pharmakologischer Inhibition oder Vinculin-*Knockout* Studien reduziert, bindet $\alpha V\beta 3$ -Integrin ausschließlich an Vn aber nicht an Fn. Eine Erhöhung der Kontraktilität durch MyosinIIA Überexpression dagegen erhöht die Fn-Bindung. Diese Daten korrelieren stark mit Effekten von Integrin-Mutationen, die $\alpha V\beta 3$ -Integrin in eine bestimmte Konformation bringen. In einer geschlossenen Konformation (*extended-closed* (EC)) wird ebenfalls ausschließlich Vn gebunden aber nicht Fn. In der maximal aktivierten *extended-open* (EO) Konformation kann neben Vn auch der Ligand Fn stabil gebunden werden. Zusammenfassend kann also folgendes Modell abgeleitet werden: in Situationen mit geringer intrazellulärer Kontraktilität befindet sich $\alpha V\beta 3$ -Integrin in der EC-Konformation und ist ein sehr selektiver Rezeptor für den Liganden Vn. Erhöhter mechanischer Zug führt zu einem Wechsel in die EO-Konformation und aus einem selektiven Vn-Rezeptor wird ein promiskuitiver Fn/Vn Rezeptor.

1

Kapitel 1

EINLEITUNG

In einem Organismus sind Zellen im Gewebe von einer komplexen 3D-Matrix aus extrazellulären Proteinen umgeben. Die Beschaffenheit dieser extrazellulären Matrix (ECM) beeinflusst das Verhalten einer Zelle und steuert Prozesse wie Zellmigration, Differenzierung oder Proliferation. Eine Zelle steht also in ständiger Kommunikation mit ihrer Umgebung. Diese Kommunikation wird über Zell-Oberflächenrezeptoren wie beispielsweise Integrine vermittelt. Dabei handelt es sich um heterodimere Transmembranproteine, die auf extrazellulärer Seite Proteine der ECM binden und auf intrazellulärer Seite einen großen Adapter- bzw. Signalkomplex rekrutieren. Über diesen Adapterkomplex sind Integrin-Rezeptoren indirekt mit dem Aktin Zytoskelett verbunden und es ergibt sich eine bidirektionale Signalweiterleitung. Signale von außen wie z.B. Beschaffenheit oder Steifigkeit der ECM werden ins Zellinnere geleitet. Andersrum können aber auch intrazelluläre Kräfte auf die ECM übertragen werden. Es handelt sich also um ein sich gegenseitig beeinflussendes System aus Zelle und ECM. RGD-bindende Integrine wie z.B. $\alpha V\beta 3$ -Integrin erkennen extrazelluläre Liganden über die RGD Sequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure). Während einige Integrin-Heterodimere auf wenige Liganden beschränkt sind zeigt $\alpha V\beta 3$ -Integrin eine sehr hohe Promiskuität und erkennt mindestens 12 verschiedene Liganden. Trotz vieler Untersuchungen ist nicht bekannt wie die Promiskuität von $\alpha V\beta 3$ -Integrin reguliert wird. In der ECM liegen *in vivo* mehrere Liganden von $\alpha V\beta 3$ -Integrin gleichzeitig vor. Wie „entscheidet“ dieser Integrin-Rezeptor also welcher Ligand gebunden wird? Zahlreiche Studien zeigen beispielsweise, dass die Konformation und Struktur von extrazellulären Proteinen einen starken Einfluss auf die Affinität für ein Integrin hat. Wie sieht es aber mit der Integrin Konformation und der intrazellulären Regulation aus? In dieser Arbeit soll anhand der Liganden Fibronectin und Vitronectin untersucht werden wie die differenzielle Ligandenbindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin funktioniert und welche intrazellulären Mechanismen vorliegen. Die nötigen Grundlagen für ein erweitertes Verständnis werden in den folgenden Kapiteln eingeleitet.

1.1 DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX

Zellen im Gewebe vielzelliger Organismen sind von einer extrazellulären Matrix (ECM) umgeben. Dabei handelt es sich um ein dreidimensionales Netzwerk aus Proteinen und Polysacchariden. Die Zellen in einem Gewebe haben also nicht nur Kontakt zu ihren Nachbarzellen, sondern auch zu den Komponenten der ECM (Abb. 1.1). Die Funktion der ECM geht dabei weit über die als Strukturgerüst bzw. passive Verankerungsmöglichkeit hinaus. Vielmehr reguliert sie durch ihre mechanische Beschaffenheit und Komposition viele zelluläre Prozesse wie z.B. Differenzierung, Proliferation oder Migration [1–4]. Umgekehrt wird auch die ECM durch Zellen dynamisch beeinflusst. Zellen sekretieren beispielsweise Matrix Makromoleküle, beeinflussen durch ECM-Umbau deren Architektur oder sind über Regulation von Metalloproteinasen am Abbau von ECM Komponenten beteiligt [3, 5, 6]. Es entsteht also ein sich gegenseitig beeinflussendes System aus Zellen und ECM, das die Homöostase im Gewebe aufrecht hält. Fehlregulation dieser Homöostase durch z.B. veränderte Steifigkeit oder veränderte Komposition der ECM kann ernsthafte pathologische Folgen wie Fibrose oder invasiven Krebs zur Folge haben [7, 8].

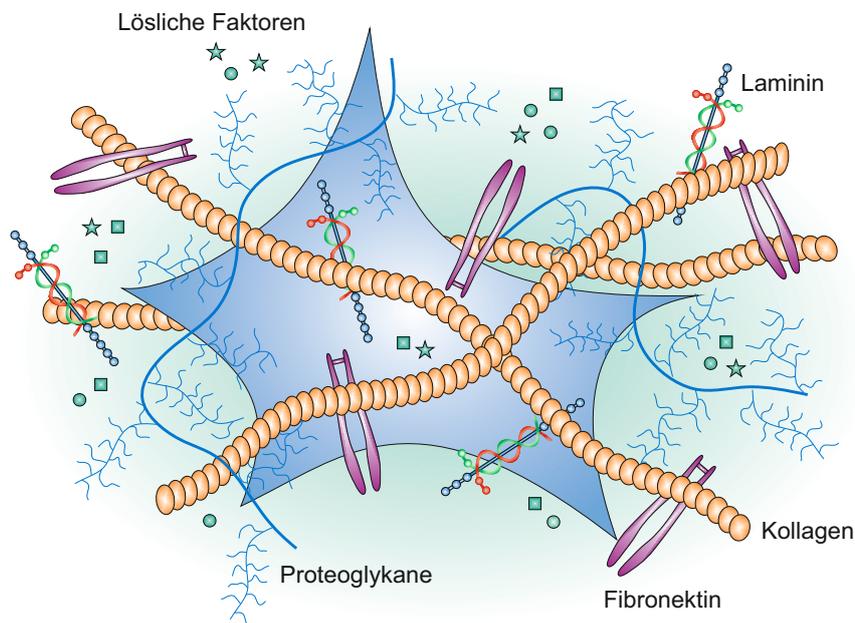


Abbildung 1.1: **Komponenten der extrazellulären Matrix.** Zellen im Gewebe sind von einer extrazellulären Matrix (ECM) umgeben. Die ECM dient Zellen und Gewebeverbänden als Strukturgerüst und bietet Verankerungsmöglichkeit. Darüber hinaus beeinflusst die Beschaffenheit und Komposition der ECM grundlegende zelluläre Prozesse wie Wachstum, Proliferation oder Differenzierung. Jedes Gewebe zeigt dabei eine spezifische Zusammensetzung von ECM Komponenten. Zu den Hauptkomponenten der meisten Gewebe gehören Kollagene, Proteoglykane und nicht-kollagene Glykoproteine wie z.B. Fibronectin oder Laminin.

Bisher wurden über 300 Proteine identifiziert, die Bestandteil der ECM vielzelliger Organismen sind [9]. Eine allgemeine Aussage über die Komponenten erweist sich aber als schwierig, da jedes Gewebe eine spezifische ECM Zusammensetzung besitzt. Auch der Anteil an ECM schwankt von Gewebe zu Gewebe. Hauptkomponenten der meisten Gewebe sind aber (i) Kollagene [10, 11], (ii) Proteoglykane [12–14] und (iii) nicht-kollagene Glykoproteine. Zur letzten Gruppe zählen beispielsweise Fibronectin (Fn), Vitronectin (Vn) oder Laminin. Diese Proteine haben Funktion im ECM-Aufbau und dienen als Liganden für Zelloberflächenrezeptoren. Damit haben sie eine Schlüsselfunktion in der Kommunikation zwischen Zellen und ECM [9, 14, 15].

1.2 DIE INTEGRIN REZEPTORFAMILIE: EIN REZEPTOR, MEHRERE LIGANDEN

Der Kontakt zwischen Zellen und der ECM wird in Metazoa über Zelloberflächen-Rezeptoren wie beispielsweise Integrine vermittelt. Strukturell handelt es sich bei Integrinen um nicht-kovalent verbundene Heterodimere aus verschiedenen α - und β -Untereinheiten. In Vertebraten wurden bisher 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten identifiziert. Je nach Kombination der verschiedenen Untereinheiten entstehen 24 funktionell unterschiedliche Rezeptoren mit unterschiedlicher Bindungsspezifität. Anhand dieser Bindungsspezifität und evolutionärer Verwandtschaftsbeziehungen können Integrine in 4 verschiedene Gruppen eingeteilt werden: RGD-Rezeptoren, Kollagen-Rezeptoren, Laminin-Rezeptoren und Leukozyten-spezifische Rezeptoren (Abb. 1.2 a) [16, 17]. Alle Integrine sind Transmembranrezeptoren mit einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne bildet die Ligandenbindungstasche und vermittelt die Interaktion mit extrazellulären Liganden [18–20]. Damit kann sich eine Zelle passiv an Proteine der ECM verankern. In den folgenden Kapiteln werden zuerst die Grundlagen der extrazellulären Bindungseigenschaften behandelt bevor die Interaktionen auf intrazellulärer Seite betrachtet werden.

Ein erster wichtiger Punkt ist die überlappende Liganden- bzw. Rezeptorspezifität. Dies bedeutet, dass ein Integrin-Heterodimer eine Vielzahl verschiedener Liganden binden kann (Abb. 1.2 b). Umgekehrt kann ein einzelner Ligand wiederum von mehreren Integrin-Rezeptoren gebunden werden. In der Literatur wird hierfür der Begriff „Promiskuität“ vorgeschlagen. Ist also von der Bindungspromiskuität eines Integrins die Rede, bezieht sich dies auf dessen Fähigkeit eine Vielzahl extrazellulärer Liganden zu binden [21–23].

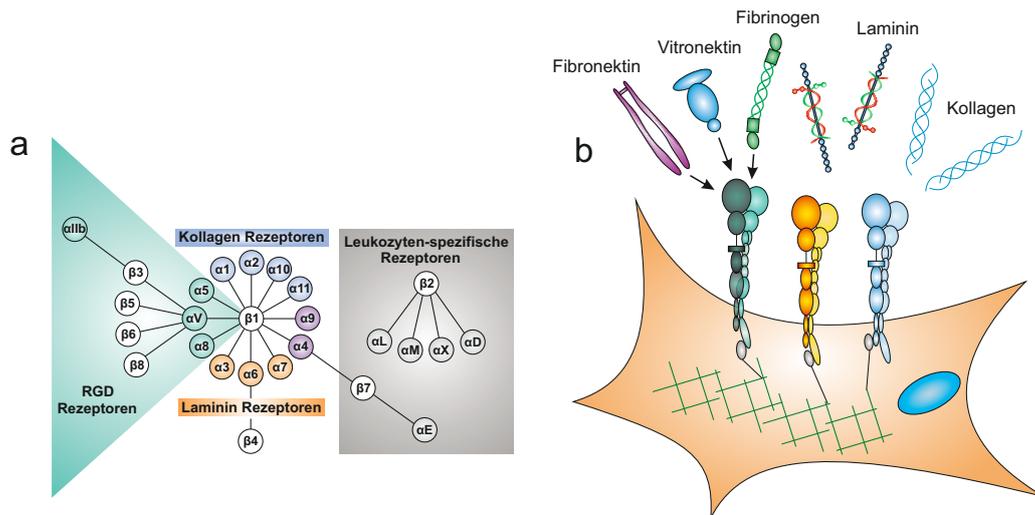


Abbildung 1.2: **Bindungspromiskuität von Integrinen.** (a) Integrin-Rezeptoren bestehen aus je einer α - und einer β -Untereinheit, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. In vielzelligen Organismen wurden bisher 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten identifiziert. Durch Kombination verschiedener Untereinheiten können insgesamt 24 unterschiedliche Integrine mit unterschiedlicher Funktion entstehen. Eine allgemeine Einteilung kann anhand der Bindungsspezifität erfolgen. Dementsprechend kann zwischen RGD-Rezeptoren (cyan), Laminin-Rezeptoren (orange), Kollagen-Rezeptoren (blau) und Leukozyten-spezifischen Rezeptoren unterschieden werden (grau). Modifiziert nach [16].

(b) Je nach Zelltyp und Zusammensetzung der ECM in einem Gewebe werden verschiedene Integrine auf der Zelloberfläche exprimiert. Dabei beschränkt sich eine Zelle nicht nur auf einen Rezeptor-Typ, sondern es werden verschiedene Integrine gleichzeitig präsentiert (z.B. RGD-Rezeptoren (cyan) zusammen mit Laminin Rezeptoren (orange) und Kollagen-Rezeptoren (blau)). Eine Vielzahl der Integrin-Rezeptoren zeigt dabei eine hohe Bindungspromiskuität. Dies bedeutet, dass ein Integrin mehrere extrazelluläre Liganden binden kann. Exemplarisch ist die Bindungspromiskuität für einen RGD-Rezeptor (cyan) dargestellt, der sowohl Fn, Vn als auch Fbg bindet.

1.3 PROMISKUITÄT VON $\alpha V \beta 3$ -INTEGRIN: VITRONEKTIN ODER FIBRONEKTIN

$\alpha V \beta 3$ -Integrin gehört zu den RGD-bindenden Integrinen und erkennt mindestens 12 verschiedene extrazelluläre Liganden. Zu den publizierten Liganden zählen beispielsweise die Proteine Vn, Fn, Fibrinogen (Fbg), Osteopontin (Opn) oder Thrombospondin (Tsp). Damit gehört $\alpha V \beta 3$ -Integrin zu den promiskuitivsten Integrin-Rezeptoren [16, 23, 24]. Die Interaktion der extrazellulären Liganden mit der Ligandenbindungstasche von $\alpha V \beta 3$ -Integrin erfolgt über eine konservierte Sequenz, der RGD-Sequenz. Dies ist eine Abfolge der Aminosäuren Arginin-Glycin-Asparaginsäure. [25, 26]. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Bindung der beiden RGD-Liganden Fn und Vn. Insbesondere soll untersucht werden wie eine differenzielle Ligandenbindung funktioniert. Für ein besseres Verständnis werden im Folgenden einige interessante Aspekte der Bindung von Fn bzw. Vn an $\alpha V \beta 3$ -Integrin behandelt.

Vn ist ein Protein, das hauptsächlich von Hepatozyten der Leber gebildet und ins Blut abgegeben wird. Seine Konzentration im Blutplasma beträgt etwa 200-400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [27, 28]. Es kommt aber nicht ausschließlich im Blut vor, sondern ist auch in geringen Mengen in zahlreichen Geweben wie beispielsweise im Bindegewebe oder Knochengewebe vertreten [29, 30]. Ursprünglich wurde $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin von Pytela und Kollegen als der Vn-Rezeptor beschrieben [31, 32]. Bis heute wird dieser Rezeptor neben $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ -Integrin als der Hauptrezeptor für Vn angesehen. Diese Aussage ergibt sich vor allem aus biochemischen Affinitätsmessungen und der daraus resultierenden Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_D). Dieser Wert gibt an in welchem Verhältnis die dissoziierte (nicht an einen Rezeptor gebunden) und undissoziierte Form (an einen Rezeptor gebunden) vorliegt. Je größer die K_D , desto weiter liegt das Gleichgewicht auf Seite der dissoziierten Form. Umgekehrt bedeutet dies, je kleiner der K_D -Wert, desto wahrscheinlicher bindet der Ligand an seinen Rezeptor und desto größer ist die resultierende Bindungsaffinität [33]. Frühe Affinitätsmessungen haben beispielsweise gezeigt, dass Vn nach Bindung an $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin nicht dissoziiert [34]. Eine genaue K_D konnte in dieser Studie daher nicht bestimmt werden. In einer späteren Arbeit von Chillakuri und Kollegen wurde für die Bindung von Vn an $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin eine K_D von etwa 12 nM gemessen [35]. Aber was sagt dieser Wert aus: zeigt er eine hohe Affinität oder eine niedrige Affinität an? Vergleichend kann man Affinitätsmessungen mit cyclischen RGD-Peptiden heranziehen, die für eine sehr spezifische Bindung an $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin optimiert wurden. Diese Messungen variieren je nach Struktur und Konformation des RGD-Peptids aber die K_D -Werte bewegen sich im Bereich von etwa 0.5-6 nM [36, 37]. Dieser Vergleich lässt vermuten, dass es sich bei der Interaktion von Vn mit $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin ($K_D = 12$ nM) um eine Bindung mit recht hoher Affinität handelt.

Wie ist die Situation aber für den Liganden Fn? Fn ist ein dimeres Glykoprotein und Grundbaustein der ECM. Prinzipiell gibt es zwei Arten von Fn. Plasma-Fn wird von Hepatozyten der Leber gebildet und zirkuliert in Konzentrationen von 300-400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im Blut [38]. Zelluläres Fn wird von zahlreichen Zelltypen wie z.B. Fibroblasten, Endothelzellen oder Chondrozyten synthetisiert [39]. Es kommt ubiquitär in zahlreichen Geweben vor und wird in Form unlöslicher Fibrillen in die ECM eingebaut [39, 40]. In der Literatur wird $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ -Integrin als Hauptrezeptor für Fn angesehen [41–43]. Es gibt aber noch zahlreiche weitere Integrin-Rezeptoren, die Fn binden können [22, 23]. Dazu gehört auch $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin. Interessanterweise wurde in den ersten Studien von Pytela und Kollegen keine bzw. nur eine sehr geringe Bindung von $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin an Fn beobachtet [31, 32]. Erst in späteren Arbeiten wurde dieses Integrin auch als Fn-Rezeptor beschrieben [44–48]. Genaue K_D -Werte für eine Bindung von Fn an $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin sind aber nicht wirklich bekannt. Charo und Kollegen haben beispielsweise gezeigt, dass $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin die beiden Liganden Fn und Vn mit ähnlicher Affinität bindet [44]. Interessanterweise scheint eine Fn-Bindung aber nur mit

einem immobilisierten Liganden möglich zu sein. In Experimenten mit löslichem, kompaktem Fn konnte keine Ligandenbindung an $\alpha V\beta 3$ -Integrin beobachtet werden [43]. Trotz der Tatsache, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin ein etablierter Rezeptor für den Liganden Fn ist, scheint eine Fn-Bindung nicht in jedem Zustand möglich. Dies lässt vermuten, dass es möglicherweise einen Mechanismus gibt über den die Bindungspromiskuität von $\alpha V\beta 3$ -Integrin reguliert werden kann.

1.4 REGULATIONS-MÖGLICHKEITEN DER PROMISKUITÄT

Obwohl die Bindung aller RGD-Liganden über das gleiche Erkennungsmotiv erfolgt, gibt es Indizien, dass einzelne Liganden mit unterschiedlicher Affinität gebunden werden [49, 50]. Bindet ein Integrin trotz hoher Promiskuität bevorzugt einen einzelnen Liganden spricht man von einer Selektivität für einen bestimmten Liganden. Wie kommt es trotz gleicher Erkennungssequenz aber zu solchen differenziellen Affinitäten?

In zahlreichen Publikationen wurde bereits der Einfluss der Struktur bzw. Konformation des Liganden untersucht. Hierfür wurde nicht der komplette Ligand sondern synthetische RGD Peptide mit wenigen flankierenden Aminosäureresten eingesetzt. Gemessen wurde der inhibitorische Effekt dieser RGD-Peptide. Dies ermöglicht indirekt Rückschlüsse auf deren Affinität für ein Integrin. Es wurde gezeigt, dass vor allem eine cyclische RGD-Struktur mit höherer Affinität gebunden wird als die lineare Sequenz [50–52]. Zudem scheinen flankierende Aminosäuren sowie die Anzahl und Position von Disulfidbrücken eine wichtige Rolle zu spielen [53–56]. Zusammenfassend entscheidet also die Struktur und Konformation eines Liganden ob dieser mit hoher oder niedriger Affinität gebunden wird.

Zusätzlich zur RGD-Sequenz besitzen einige RGD-Liganden noch weitere Erkennungssequenzen wie beispielsweise synergistisch wirkende Bindestellen. Fn z.B. enthält eine molekulare Region, die als *synergy site* bezeichnet wird. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass $\alpha 5\beta 1$ -Integrin den Liganden Fn sowohl über die RGD-Sequenz als auch die *synergy site* bindet. Nur wenn beide Bindestellen gleichzeitig gebunden sind, kann die maximale Bindungsstärke erreicht werden [57–60]. Für $\alpha V\beta 3$ -Integrin, das ebenfalls Fn bindet, erfolgt die Fn-Bindung unabhängig von der *synergy site* [61, 62]. Es ist also möglich, dass solche synergistisch wirkenden Bindestellen eine zusätzliche Ebene der Regulation erlauben. Vermutlich gibt es noch zahlreiche weitere Regulationsmöglichkeiten. Sehr wenig ist beispielsweise über die Rolle der Integrin-Konformation oder über eine intrazelluläre Regulation der Rezeptor-Selektivität bekannt. Beide Punkte werden in dieser Arbeit adressiert.

1.5 ZELL-MATRIX ADHÄSIONEN: VON PASSIVER VERANKERUNG ZUM SIGNALKNOTENPUNKT

Bisher wurden ausschließlich die extrazellulären Bindungseigenschaften von Integrinen behandelt. Wie bereits erwähnt handelt es sich bei Integrinen um Transmembranrezeptoren. Durch die Verankerung in der Plasmamembran kann eine stabile Bindung an die ECM erreicht werden. Integrin-Rezeptoren sind allerdings nicht nur passive Anker, die strukturellen Halt für Zellen oder Gewebeverbände geben. Vielmehr wird auf cytoplasmatischer Seite eine Vielzahl an Adapterproteinen und Signalkomponenten an die intrazelluläre Domäne des Integrin-Rezeptors rekrutiert. Das gesamte Netzwerk an intrazellulären Adaptoren wird als Adhäsom bezeichnet [63–65]. Über spezielle Proteine dieses Adapterkomplexes wird auch eine indirekte Verbindung zum Aktin-Zytoskelett hergestellt (Abb. 1.3 b). Der Integrin-Rezeptor fungiert in diesem Setup quasi als “Brücke“, wodurch die Aktin/Myosin Maschinerie mechanisch an Komponenten der ECM gekoppelt wird. Es entsteht also ein System, das bidirektionale Weiterleitung von mechanischen oder biochemischen Signalen entlang der Plasmamembran ermöglicht [16, 66]. Somit können beispielsweise intrazelluläre Kräfte der Aktin/Myosin Maschinerie auf Komponenten der ECM übertragen werden. Dies ermöglicht Prozesse wie gerichtete Zellmigration oder Remodellierung bzw. Umbau der ECM [67–69]. Umgekehrt können über Integrin-vermittelte Adhäsionen aber auch Informationen wie z.B. Komposition oder chemische- und mechanische Eigenschaften der ECM erkannt werden [70]. Da Integrine selbst keine enzymatische Funktion besitzen, werden solche Informationen als biochemische Signale über den gebundenen Signalkomplex ins Zellinnere geleitet. Je nach Art des Signals werden verschiedene zelluläre Antworten eingeleitet wie z.B. Reorganisation des Zytoskelettes oder Regulierung des Zellzyklus [71, 72].

1.6 DYNAMIK VON ZELL-MATRIX ADHÄSIONEN

Ein einzelnes Integrin macht allerdings noch keinen stabilen Kontakt zwischen einer Zelle und der ECM aus. Zudem kann ein einzelnes Integrin kein Signalnetzwerk auf intrazellulärer Seite etablieren. Damit ein funktionaler Zell-Matrix Kontakt mit bidirektionaler Signalweiterleitung entsteht, müssen mehrere Integrin-Rezeptoren durch laterales *Clustering* zusammenlagern (Abb. 1.3 b). Dieser Prozess wird als Reifung von Zell-Matrix Adhäsionen bezeichnet. Dabei wird zwischen morphologischer und kompositioneller Reifung unterschieden [73]. Bei der morphologischen Reifung vergrößert sich der Kontakt durch Rekrutierung zahlreicher Integrin-Rezeptoren. Aktuelle Daten zeigen mittels hochauflösender Mikroskopie (PALM), dass etwa 50 zusammengelagerte Integrin-Rezeptoren erste Nanocluster mit einer

Größe von 100 nm bilden [74]. Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, dass noch kleinere Cluster existieren, die unter dem Auflösungslimit hochauflösender Mikroskopie liegen. Diese punktförmigen Nanocluster werden als *nascent adhesions* ($< 0.25 \mu\text{m}$) bezeichnet und reifen schließlich zu größeren Fokalkomplexen ($0.5 \mu\text{m}$) oder länglichen Strukturen, die Fokalkontakte ($1\text{-}5 \mu\text{m}$) genannt werden [73, 75]. In mikroskopischen Aufnahmen adhärierter Zellen sind Fokalkontakte hauptsächlich in der Zellperipherie an den Enden von Aktin Stressfasern lokalisiert (Abb. 1.3 a) [76–78]. Gleichzeitig zur morphologischen Reifung vergrößert sich auch die molekulare Komplexität der Zell-Matrix Adhäsionen (= kompositionelle Reifung). Dies bedeutet, dass mit zunehmender Reifung auch vermehrt intrazelluläre Adapterproteine und Signalkomponenten rekrutiert werden (Abb. 1.3 b) [79, 80]. Zum einen kann dadurch eine Kopplung an das Aktin-Zytoskelett erreicht werden [81, 82]. Zum anderen kann je nach Setup intrazellulärer Adaptoren das zelluläre Verhalten beeinflusst werden [83].

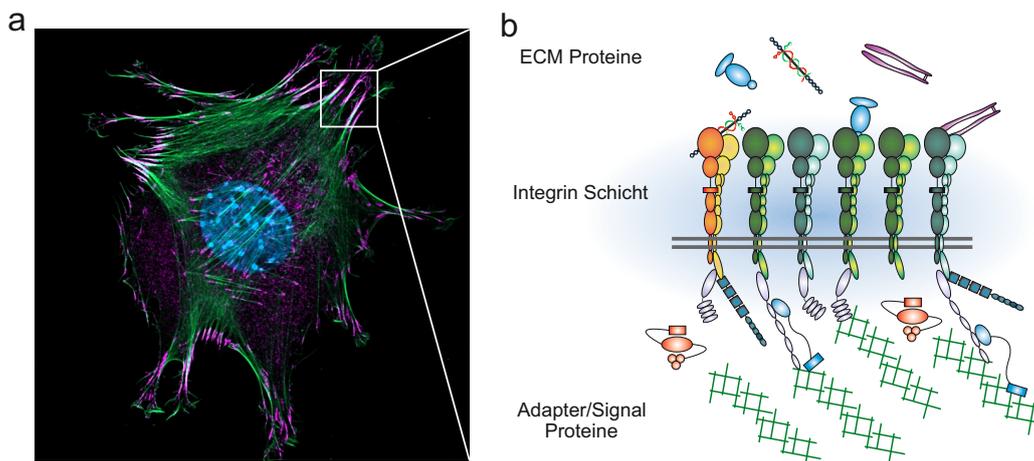


Abbildung 1.3: Bildung von Zell-Matrix Kontakten. (a) In mikroskopischen Aufnahmen sind Zell-Matrix Kontakte vor allem in der Zellperipherie lokalisiert. Je nach Reifestadium reicht die Morphologie von punktförmigen Adhäsionen (*nascent adhesions*) bis zu länglichen Strukturen (Fokalkontakte). Die Enden der Zell-Matrix-Adhäsionen sind typischerweise mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert.

(b) In Zell-Matrix Adhäsionen kommt es zur lateralen Zusammenlagerung von zahlreichen Integrin-Rezeptoren. Diese binden auf extrazellulärer Seite an Proteine der ECM während auf intrazellulärer Seite ein riesiger Adapter- bzw. Signalkomplex rekrutiert wird. Einige dieser Adapterproteine koppeln Integrine indirekt an das Aktin-Zytoskelett. Die Zusammensetzung des intrazellulären Adapterkomplexes verändert sich mit zunehmender Adhäsionsreifung.

Ebenso wichtig wie die Bildung von Zell-Matrix Adhäsionen ist deren Abbau. Beide Prozesse müssen örtlich und zeitlich streng kontrolliert werden. Dies ist wichtig für viele Integrin-abhängige Prozesse. Bei der gerichteten Zellmigration müssen Zellen beispielsweise an der Zellfront neue Adhäsionen bilden, die dort intrazelluläre Kräfte für die Fortbewegung auf die

ECM übertragen. Am Zellende dagegen müssen bestehende Adhäsionen abgebaut werden, damit der Zellkörper nachgezogen werden kann [84–86]. Ein wichtiger Faktor, der die Balance zwischen Auf- und Abbau reguliert, ist die Aktin/Myosin Maschinerie [75, 87–90]. Es ist mittlerweile gut beschrieben, dass eine Erhöhung kontraktile Kräfte den Aufbau von Zell-Matrix Adhäsionen fördert [91, 92]. Umgekehrt führt eine Reduktion kontraktile Kräfte zu deren Abbau. Werden Zellen beispielsweise mit Blebbistatin, einem Myosin-Inhibitor behandelt, kann man einen schnellen Abbau maturierter Adhäsionen beobachten und stattdessen erhöht sich die Anzahl von *nascent adhesions* [93, 94]. Ein ähnlicher Effekt zeigt sich auf weichen Zellkultursubstraten. Auf solchen Substraten können Zellen geringere kontraktile Kräfte generieren als auf steifen Substraten [95, 96]. Auch die Zell-Matrix Adhäsionen sind deutlich kleiner und weniger maturiert [97]. Dies zeigt, dass kontraktile Kräfte eine wichtige Funktion im Auf- und Abbau von Fokalkontakten besitzen.

Neben der Aktin/Myosin Kontraktilität gibt es natürlich noch zahlreiche weitere Mechanismen, um die Dynamik von Zell-Matrix Adhäsionen zu regulieren. Prominente Beispiele sind Calpain-vermittelte Proteolyse von Bestandteilen der Fokalkontakte, Autophagozytose oder Mikrotubuli-induzierter Abbau [98–103].

1.7 MECHANOSENSING IN ZELL-MATRIX ADHÄSIONEN: WENN KRÄFTE ZU SIGNALLEN WERDEN

Aber wie genau können intrazelluläre Kräfte den Reifungsprozess bzw. die Dynamik von Zell-Matrix Adhäsionen regulieren? Ein möglicher Grund sind mechanosensitive Elemente in den Kontakten [73, 93]. Solche Proteine erfahren eine Konformationsänderung wenn kontraktile Kräfte auf sie wirken. Dadurch werden beispielsweise Bindestellen für neue Proteine oder aber auch Phosphorylierungsstellen für Kinasen frei, die wiederum die Rekrutierung weiterer Signalproteine erlauben [104, 105]. Im Prinzip werden also mechanische Reize in biochemische Signale umgewandelt, die schließlich zu einer zellulären Antwort führen. Dieser Prozess wird als Mechanotransduktion bezeichnet [106].

Ein prominentes Beispiel für ein mechanosensitives Protein in Zell-Matrix Adhäsionen ist Talin. Talin ist eines der ersten Proteine, das in Fokalkontakte rekrutiert wird und es verbindet Integrine direkt mit Aktin. Durch diese Verbindung zu Aktin können Kräfte der Aktin/Myosin Maschinerie direkt auf das Talin-Molekül übertragen werden. Strukturell besitzt Talin 13 helicale Domänen mit unterschiedlicher mechanischer Stabilität. Alle diese Domänen können durch kontraktile Kräfte im physiologischen Bereich entfaltet werden [107–109]. Dabei werden Bindestellen frei, die vorher in der gefalteten helicalen Struktur verborgen waren. So können beispielsweise 11 Bindestellen für das Protein Vinculin freigelegt werden.

Vinculin selbst besitzt wiederum eine Aktin-Bindestelle wodurch der Kontakt zum Aktin Zytoskelett verstärkt und die gesamte Adhäsion stabilisiert wird [110, 111]. Die Entfaltung der helicalen Bündel in Talin ist zudem reversibel. Das heißt wenn die Zugspannung auf Talin verringert wird und unter einen Schwellenwert fällt, können die helicalen Domänen wieder in den gefalteten Zustand wechseln. Im gefalteten Zustand werden Bindestellen präsentiert, die wiederum im aufgefalteten Zustand nicht verfügbar sind. Demnach wird vermutet, dass jedes der 13 helicalen Bündel ein unterschiedliches Setup an Proteinen im gefalteten bzw. aufgefalteten Zustand binden kann [112–114]. An diesem Beispiel wird deutlich, dass mechanische Kräfte einen großen Einfluss auf die Rekrutierung intrazellulärer Adaptoren und somit auf die Mechanotransduktion in Zell-Matrix Adhäsionen haben.

Neben Talin als mechanosensitiven Signal-Knotenpunkt in Zell-Matrix Adhäsionen gibt es noch zahlreiche weitere mechanosensitive Elemente im Adhäsom. Ein weiteres Beispiel ist der Integrin-Rezeptor selbst. Um aber detailliert zu verstehen wie mechanische Kräfte auf ein Integrin wirken, muss erstmal geklärt werden wie genau ein Integrin auf Einzelmolekülebene funktioniert.

1.8 INTEGRIN AKTIVIERUNG: EIN REZEPTOR, MEHRERE KONFORMATIONEN

Integrine auf der Zelloberfläche sind nicht konstitutiv aktiv. Sie können auch in einem inaktiven Zustand vorliegen und müssen für eine Ligandenbindung aktiviert werden. Dieser Prozess wird als Integrin-Aktivierung bezeichnet und ermöglicht es einer Zelle die örtliche sowie zeitliche Ligandenbindung zu kontrollieren [115, 116]. Ein aktives Integrin kann auf zwei verschiedene Arten beschrieben und definiert werden. Zum einen über die Funktion und zum anderen über die strukturelle Konformation. Eine Definition über die Funktion scheint einfach, da die Fähigkeit einen Liganden zu binden ein aktives Integrin ausmacht. Eine strukturelle Definition ist weitaus schwieriger, da ein Integrin im Verlauf der Aktivierung allosterischen Konformationsänderungen unterliegt. Welche Konformation ist aber für ein aktives Integrin notwendig? Bisher wurden drei Hauptkonformationen beschrieben, die in der Literatur weitgehend anerkannt sind. Zumindest trifft dies für $\beta 2$ - und $\beta 3$ -Integrine zu. Ob diese Einteilung für weitere Integrine wie z.B. $\beta 1$ - oder $\beta 8$ -Integrine der Fall ist, wird kontrovers diskutiert [117–119]. Im Folgenden werden die Konformationsänderungen während der Integrin-Aktivierung beschrieben, wie sie für $\alpha 3\beta 3$ vorliegen könnten (Abb. 1.4).

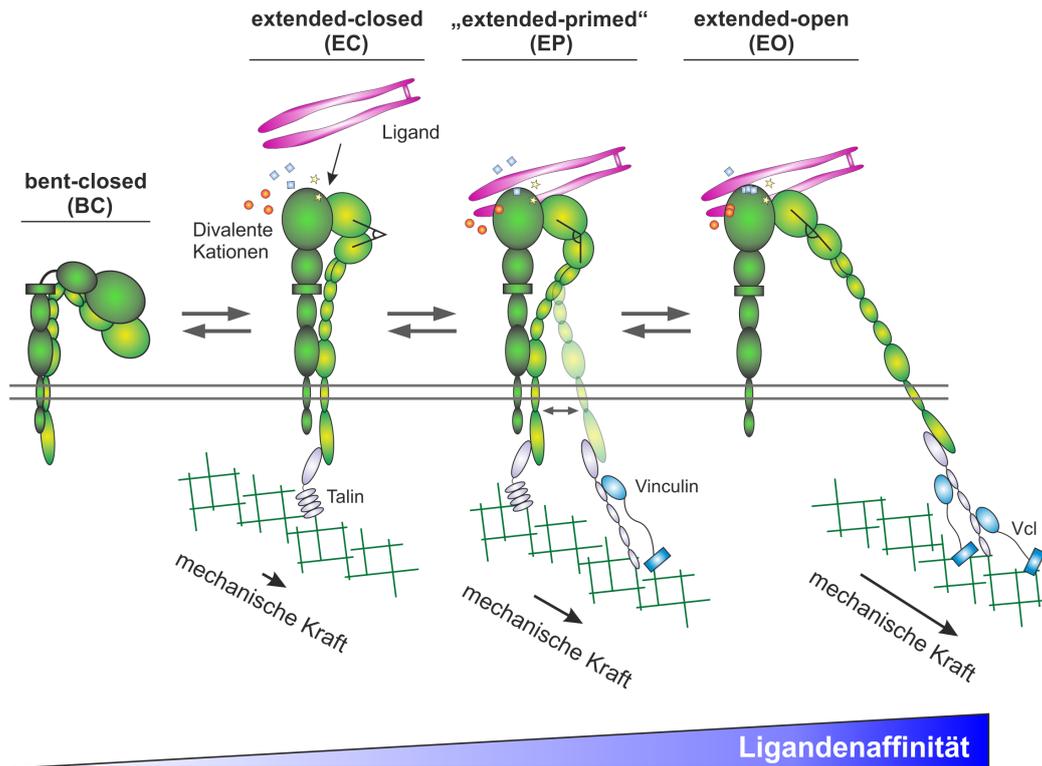


Abbildung 1.4: **Konformationsänderungen während der Integrin Aktivierung.** Integrine sind nicht konstitutiv aktiv und können je nach Aktivierungszustand in verschiedenen Konformationen vorliegen. Dabei wird zwischen *bent-closed*, *extended-closed*, *extended-primed* und *extended-open* Konformation unterschieden. Der Wechsel zwischen den verschiedenen Konformationen erfolgt durch allosterische Konformationsänderungen und ist zudem reversibel. Ein wichtiger Schlüsselschritt für maximale Aktivierung ist die Auslenkung der Hybrid-Domäne relativ zur β A-Domäne. Dies führt zu einer starken Erhöhung der Affinität für extrazelluläre Liganden. Eine örtliche und zeitliche Kontrolle der Integrin Aktivierung wird dabei über intrazelluläre Signale wie z.B. mechanische Krafteinwirkung oder Rekrutierung des Adapterproteins Talin erreicht. Umgekehrt können auch extrazelluläre Signale wie z.B. Ligandenbindung oder divalente Kationen ein Integrin in der aktivierten Form stabilisieren.

Die *bent-closed* (BC) Konformation wird als die inaktive Form beschrieben. Kristallstrukturanalysen zeigen, dass Integrine in diesem Zustand in einer kompakten, gebeugten Konformation vorliegen (Abb. 1.4, BC). Die Ligandenbindungstasche ist der Plasma-Membran zugeneigt [120]. Wird das Integrin aktiviert kommt es zu wichtigen Konformationsänderungen. Ein Schlüsselschritt ist das Aufrichten der Kopfdomänen der α - und β -Untereinheiten in die *extended-closed* (EC) Konformation (Abb. 1.4, EC). Diese aufgerichtete Konformation mit geschlossener Kopfgruppe wird in der Literatur ebenfalls als inaktive Konformation angesehen [121–123]. Um das Integrin schließlich in die aktive, sogenannte *extended-open* (EO) Konformation zu bringen, sind weitere Konformationsänderungen nötig (Abb. 1.4, EO). Zum einen kommt es zur Separierung der α - und β -Untereinheiten, die in der inaktiven Konformation durch eine Salzbrücke zusammengehalten werden. Diese Salzbrücke

bewirkt eine physikalische Verbindung zwischen R995 der α -Untereinheit und D723 der β -Untereinheit. Wird sie aufgebrochen, kommt es zur Separierung der beiden Untereinheiten und zur Integrin Aktivierung [124–127]. Ein weiterer Schlüsselschritt ist die Öffnung der Kopfgruppe, was in der Literatur als *headpiece-opening* bezeichnet wird. Charakteristisch für diesen Schritt ist die Auslenkung der Hybrid-Domäne relativ zur β A-Domäne [121, 128, 129]. Möglicherweise gibt es zwischen diesen drei Hauptkonformationen noch weitere intermediäre Konformationen. In einigen Publikationen wurden solche Konformationen bereits vorgeschlagen und als *extended-primed* (EP) Konformation bezeichnet. In dieser Konformation ist das Integrin in einer aufgerichteten Form aber die Hybrid Domäne ist nicht maximal ausgelenkt (Abb. 1.4 EP) [130–132].

Warum kann ein einzelnes Integrin aber so viele verschiedene Konformationen annehmen? In der Literatur ist die Meinung vertreten, dass jede Konformation mit einer unterschiedlichen Affinität für extrazelluläre Liganden assoziiert ist [133]. Es ist allerdings schwierig einer einzelnen Konformation ein eindeutiges Affinitätsprofil zuzuweisen, da die meisten Affinitätsmessungen mit einem unbekanntem Mix verschiedener Integrin Stadien durchgeführt wurden. Generell ist im Integrin-Feld aber eher die Meinung vertreten, dass nur die EO-Konformation aktiv ist [129, 134]. In diesem Zusammenhang wurde für einige Integrin-Rezeptoren gezeigt, dass die Auslenkung der Hybrid Domäne eine 1000-6000fach erhöhte Affinität für extrazelluläre Liganden bewirkt [135, 136]. Die BC- und EC-Konformation dagegen, werden beide als weitgehend inaktive Form mit einer niedrigen Affinität für Liganden angesehen. Die EP-Konformation soll eine intermediäre Affinität besitzen, da sie strukturell gesehen nicht maximal aktiviert ist [132]. Momentan ist diese Konformation-Funktion Beziehung weitgehend anerkannt. Es gibt aber auch Studien, die zeigen, dass die BC- sowie die EC-Konformation einiger Integrin-Rezeptoren physiologische Liganden binden kann [123, 137–139]. Es ist also nicht trivial einer Integrin Konformation eine zugehörige Funktion zuzuweisen. Höchstwahrscheinlich variiert die Funktion-Konformation Beziehung auch von Integrin zu Integrin. Interessanterweise wurde auch vermutet, dass der Ligand dabei eine entscheidende Rolle spielt. Dies würde bedeuten, dass ein aktives Integrin für einen bestimmten Liganden wiederum ein inaktives Integrin für einen anderen Liganden sein könnte [140].

1.9 INTRAZELLULÄRE REGULATION DER INTEGRIN-AKTIVIERUNG

Wie kommt es aber im Verlauf der Integrin-Aktivierung zu diesen Konformationsänderungen? Prinzipiell liegt das thermodynamische Gleichgewicht auf Seite der BC-Konformation. In diesem Zusammenhang wurde beispielsweise für α -5 β 1-Integrin gezeigt, dass 99,75 % der membranständigen Integrin Population in der BC-Konformation vorliegt [134, 141]. Dies macht deutlich, dass eine Energiebarriere überwunden werden muss, damit ein Integrin in die EO-Konformation wechseln kann. Um diese „Hürde“ zu überwinden ist ein zellulärer Energieaufwand nötig. Mittlerweile ist gut beschrieben, dass verschiedene intrazelluläre Signale einen solchen Energieaufwand bereitstellen können und damit einen Einfluss auf die Konformation des Integrin-Rezeptors haben. Talin beispielweise ist eines der ersten Proteine, das intrazellulär an den Adhäsionskomplex rekrutiert wird [126]. Dabei stellt es nicht nur die erste Verbindung zum Aktin-Zytoskelett her, sondern hat auch aktivierende Funktion [142, 143]. Talin bindet dabei an den intrazellulären Teil der β -Untereinheit und bricht durch ionische Wechselwirkungen die Salzbrücke zwischen der α - und β -Untereinheit auf [144–146]. Dies führt zur Separierung der α/β cytoplasmatischen Domänen und zum Aufrichten des Integrin-Rezeptors [146, 147]. In artifiziellen Lipidmembranen wurde allerdings gezeigt, dass Talin in Abwesenheit mechanischer Kräfte und anderen Adaptoren nur eine Fraktion (etwa 22 %) von α IIb β 3-Integrin in den aktiven, aufgerichteten Zustand überführen konnte [148]. Dies zeigt, dass andere Aktivatoren wie beispielsweise Kindlin oder Aktin-vermittelte Kontraktilität ebenfalls eine wichtige Rolle spielen [126, 149].

Es ist also fraglich ob Talin Aktivierung alleine ein Integrin maximal aktivieren kann. Sun und Kollegen vermuten vielmehr, dass der energetische Input von Talin nicht ausreichend ist, um eine Auslenkung der Hybrid Domäne zu erreichen und um das Integrin in seine EO-Konformation zu bringen [150]. Woher kommt aber die notwendige Energie für diesen Konformationswechsel? An diesem Punkt kommen wieder intrazelluläre Kräfte ins Spiel. In einem plausiblen Modell wird diese Energie nämlich durch mechanische Kraft der Aktin/Myosin Maschinerie bereitgestellt. Diese Kräfte werden entlang der Talin/Vinculin Achse auf das Integrin-Molekül übertragen. Simulationen und experimentelle Daten bestätigen dieses Modell und zeigen, dass mechanische Kräfte zu einer Auslenkung der Hybrid Domäne und damit zu maximaler Integrin Aktivierung führen [151–155]. Messungen mit Kräftesensoren in lebenden Zellen sowie Kalkulationen zeigen, dass die benötigten Kräfte im physiologischen Bereich liegen (1-3 pN) [141, 156]. Diese Werte beziehen sich auf α 5 β 1-Integrin. Andere Integrin-Rezeptoren benötigen höchstwahrscheinlich ein anderes Kräfteprofil für einen Wechsel in die EO-Konformation [136, 150]. Diese Daten lassen vermuten, dass Integrine selbst mechanosensitiv sind. Mechanische Kräfte auf intrazellulärer Seite führen demnach zu einer veränderten Konformation und möglicherweise Funktion auf extrazellulärer Seite.

1.10 EXTRAZELLULÄRE REGULATION DER INTEGRIN-AKTIVIERUNG

Neben intrazellulären Signalen gibt es auch extrazelluläre Signale, die den Aktivitätszustand eines Integrins regulieren. Beide Konzepte werden zwar oft getrennt betrachtet, aber höchstwahrscheinlich finden beide Signalwege gleichzeitig statt. Ein wichtiges Ereignis auf extrazellulärer Seite, das beispielsweise einen Einfluss auf die Integrin Aktivierung hat, ist die Ligandenbindung selbst. Bindet ein Ligand an ein Integrin führt dies zu aktivierenden Konformationsänderungen bzw. zu einer Stabilisierung der aktiven Konformation [157–159]. Im Folgenden wird aber hauptsächlich die aktivierende Funktion von divalenten Kationen oder chemischen Verbindungen beschrieben, die für diese Arbeit relevant sind.

Die divalenten Kationen Magnesium (Mg^{2+}), Calcium (Ca^{2+}) und Mangan (Mn^{2+}) spielen eine wichtige Rolle für die Integrin-Ligand Interaktion [160–162]. All diese Ionen sind in einer physiologischen Situation vorhanden. Die Ca^{2+} - und Mg^{2+} Konzentrationen bewegen sich im Maßstab von wenigen mM, während Mn^{2+} in niedrigeren Konzentrationen vorkommt (1-14 μ) [163–165]. Eine Bindung dieser Ionen erfolgt auf extrazellulärer Seite in den sogenannten Metallionen Bindestellen. Die Bindestellen werden MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*), ADMIDAS (*adjacent to MIDAS*) und SyMBS (*synergistic metal ion binding site*) genannt. Im Falle von $\alpha V\beta 3$ -Integrin, das für diese Arbeit relevant ist, befinden sich die Bindestellen alle im Zentrum der Ligandenbindungstasche der βI -Domäne der β -Untereinheit [120, 166]. Je nach Koordination dieser Metallionen Bindestellen oder je nachdem welche Ionen in welcher Konzentration gebunden werden, kann dies einen positiven oder negativen Effekt auf die Ligandenbindung haben. Vereinfacht gesagt erhöht eine Bindung von Mn^{2+} oder Mg^{2+} die Affinität eines Integrin-Rezeptors für Liganden. Hohe Konzentration an Ca^{2+} dagegen haben einen negativen Effekt auf die Ligandenbindung [165, 167, 168]. Wie aber kann eine Bindung von Metallionen die Affinität eines Integrin-Rezeptors regulieren?

Im Fall von Mn^{2+} gibt es bereits zahlreiche Studien, die dessen aktivierende Funktion für verschiedene Integrin-Rezeptoren belegen [165, 166, 169, 170]. Allerdings gibt es widersprüchliche Angaben wie diese Aktivierung zustande kommt. Einige Publikationen zeigen, dass die Bindung von Mn^{2+} eine Konformationsänderung von der BC-Konformation in eine aufgerichtete (*extended* Konformation) bewirkt [132, 171]. Eng und Kollegen vermuten allerdings, dass Mn^{2+} nur eine Aktivierung in die EC-Konformation ermöglicht. Für einen Wechsel in die maximal aktivierte EO-Konformation wird zusätzlich Ligandenbindung benötigt [171]. Unterstützend für diese Interpretation wurde gezeigt, dass Mn^{2+} die Affinität eines Integrin-Rezeptors für extrazelluläre Liganden erhöhen kann, aber keine maximale Affinität erreicht wird [172]. Andere Studien besagen wiederum, dass Mn^{2+} keine globalen Konformationsänderungen bewirkt und Integrine auch nach Mn^{2+} -Aktivierung in der BC-Konformation vorliegen können [137, 166, 173]. Auch in Experimenten mit Integrinen

in einer Membranumgebung konnte nach Mn^{2+} -Aktivierung keine veränderte Höhe der Integrin-Rezeptoren im Vergleich zu einer inaktiven Kontrollgruppe beobachtet werden [174]. Zusammenfassend lässt sich anhand der aktuellen Datenlage nur sagen, dass Mn^{2+} die Affinität zahlreicher Integrine für deren extrazelluläre Liganden erhöht. Welche Auswirkungen eine Mn^{2+} -Aktivierung auf die Integrin Struktur hat wird noch diskutiert. Momentan anerkannt ist aber eher, dass sich ein Mn^{2+} aktiviertes, Liganden gebundenes Integrin in der EO-Konformation befindet. Höchstwahrscheinlich kann dies aber auch von Integrin zu Integrin und je nach zellulärem Kontext variieren [174].

Die Wirkung von Ca^{2+} dagegen hat einen inhibitorischen Effekt auf die Ligandenbindung [175, 176]. Physiologische Konzentrationen von 1 mM Ca^{2+} reichen bereits aus, um ein Integrin in einem Zustand mit niedriger Affinität für extrazelluläre Liganden zu stabilisieren [177]. Allerdings ist nicht wirklich bekannt welche Konformation ein Integrin in Anwesenheit hoher Konzentrationen Ca^{2+} einnimmt. Tiwari und Kollegen zeigen mithilfe konformationsspezifischer Antikörper, dass Integrine während dem Transport zur Zellmembran in der inaktiven, gebeugten Konformation vorliegen. Diese wird durch Ca^{2+} Bindung erreicht [178]. Erst wenn die Ca^{2+} -Ionen an der Membran entfernt oder durch andere Metallionen ausgetauscht werden, kann eine Aktivierung stattfinden. Dies lässt vermuten, dass Ca^{2+} ein Integrin möglicherweise in einer Konformation stabilisiert, die der BC-Konformation ähnelt. Auch Xia und Kollegen vermuten, dass $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin durch Besetzung der ADMIDAS mit Ca^{2+} in die geschlossene Konformation wechselt [179]. Wie diese Situation für $\alpha V \beta 3$ -Integrin aussieht bleibt unklar.

Ein weiterer Aktivator von Integrinen ist das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT). Dabei handelt es sich um eine chemische Verbindung, die Disulfidbrücken zwischen zwei Cystein-Resten reduziert und diese Bindungen quasi aufbricht. Integrine besitzen zahlreiche solcher Disulfidbrücken in ihrer Struktur zwischen konservierten Cysteinen [180–182]. Einige dieser Disulfidbrücken sind in Lösung zugänglich und können durch den Einsatz von DTT reduziert werden. In zahlreichen Studien wurde DTT bereits als Aktivator von Integrinen beschrieben [173, 183–185]. Durch das Aufbrechen der Disulfidbrücken durch DTT kommt es dabei zu Konformationsänderungen in der Integrin Struktur. Dies führt zu einer Erhöhung in der Affinität für extrazelluläre Liganden [186, 187]. Es wird vermutet, dass die aktivierende Funktion von DTT stärker ist als die von Mn^{2+} . Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass DTT eine Konformationsänderungen bewirkt, die unterschiedlich zu einer Mn^{2+} -Aktivierung ist und die Ligandenbindungstasche zugänglich für extrazelluläre Liganden macht [173, 184, 187]. Wie genau sich die Konformationen nach Mn^{2+} bzw. DTT Aktivierung auf struktureller Ebene unterscheiden, muss allerdings noch geklärt werden.

1.11 ZELLKULTURSUBSTRATE

Zellen im Gewebe können stark von biochemischen und physikalischen Signalen der Umgebung beeinflusst werden. Zu diesen Signalen zählen beispielsweise Komposition der ECM, mechanische Steifigkeit, geometrische Verteilung von ECM-Proteinen oder Topographie. All diese Faktoren beeinflussen das Verhalten zahlreicher Zelltypen und steuern grundlegende Prozesse wie z.B. Differenzierung, Proliferation oder Migration [188–193]. In den letzten Jahren gab es zahlreiche experimentelle Studien, die sich mit der Zellreaktion auf solche äußeren Reize befassten. Dies war vor allem durch den Einsatz und die Weiterentwicklung von speziellen Zellkultursubstraten möglich. In der Literatur werden vor allem zweidimensionale (2D) bzw. dreidimensionale (3D) Zellkultursubstrate eingesetzt [188, 189, 194, 195]. Bis heute ist die einfachste Methode der Einsatz von flachen, 2D-Zellkultursubstraten. Damit kann zwar keine 3D-Umgebung - wie sie Zellen *in vivo* erfahren - imitiert werden, aber es kann vereinfacht eine Zellreaktion auf einen bestimmten physikalischen Reiz untersucht werden [80, 189, 196]. Die artifizielle Umgebung von 3D-Substraten dagegen entspricht schon eher der *in-vivo* Situation. Interessanterweise zeigen Zellen auch bedeutende Unterschiede in ihrem Verhalten wenn sie auf 2D- bzw. 3D-Substraten kultiviert werden [197, 198]. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Proteinzusammensetzung von Zell-Matrix Kontakten. In einer 2D-Umgebung werden andere Proteine in diese Art von Kontakt rekrutiert als in einer 3D-Umgebung [199]. In dieser Arbeit wird eine spezielle Variante eines 2D-Substrates eingesetzt. Im Folgenden werden daher einige Aspekte von 2D-Zellkultursubstraten behandelt.

Oftmals kann mit 2D-Substraten sehr einfach und effektiv die Zellreaktion auf einen spezifischen äußeren Reiz untersucht werden. Prinzipiell können viele Einflussfaktoren der ECM wie z.B. Steifigkeit, Proteinkomposition oder geometrische Verteilung von ECM-Proteinen variiert werden. So kann man beispielsweise Substrate mit unterschiedlicher Steifigkeit herstellen, um die mechanischen Eigenschaften von Geweben zu simulieren. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass zahlreiche Zelltypen auf weichen Hydrogelen geringere zelluläre Kräfte generieren können als auf harten Glassubstraten [95, 200, 201]. Auch die Zellmigration ist auf weichen Substraten reduziert. Werden Zellen wie z.B. Fibroblasten auf einem Substrat mit einem Steifigkeitsgradienten ausgesät, kann eine gerichtete Zellmigration von weichen zu harten Bereichen beobachtet werden [202, 203].

Ein weiterer Einflussfaktor, der durch speziell entwickelte Zellkultursubstrate untersucht werden kann ist die geometrische Verteilung von ECM-Liganden. In vielen Studien werden Zellen mit einer homogen beschichteten Proteinoberfläche konfrontiert. Dies entspricht nicht der *in vivo* Situation, da Zelladhäsion prinzipiell an der gesamten Oberfläche möglich ist und Zellen sich nach belieben ausbreiten können. In einer physiologischen Umgebung sind die Proteine der ECM nicht homogen sondern vielmehr strukturiert verteilt. Je nach Gewebe

ist diese Strukturierung im Nanometer- bzw. Mikrometermaßstab wodurch oftmals nur eine selektive Zelladhäsion möglich ist [204–206]. Ingber und Kollegen zeigten bereits, dass die geometrische Verteilung der Liganden sowohl Größe als auch Form einer Zelle bestimmt [207]. Um eine solche Zellreaktion auf eine unterschiedliche geometrische Verteilung der ECM-Proteine zu untersuchen wurden Methoden der Oberflächenstrukturierung wie z.B. das *microcontact printing* (μ CP) entwickelt [208–210]. Dabei wird ein spezifisches Proteilmuster auf ein Glassubstrat gestempelt und die Bereiche zwischen dem Muster werden passiviert. Diese passivierten Bereiche erlauben keine Zelladhäsion. Mithilfe dieser Methode konnten bereits interessante Beobachtungen gemacht werden wie das zelluläre Verhalten von der Architektur der ECM reguliert wird. Werden ECM-Adhäsionspunkte beispielsweise in einem Abstand von weniger als 5 μ m platziert, breiten sich Zellen annähernd wie auf homogen beschichteten Substraten aus. Wenn der Abstand auf 5-25 μ m vergrößert wird passen sich die Zellen der geometrischen Form des Musters an und bilden Aktinstressfasern zwischen den Fokalkontakten an den Proteinpunkten. Ab einer Distanz von 30 μ m sind Zellen nicht mehr in der Lage die passivierten, nicht-adhäsiven Bereiche zu überbrücken [189]. Variiert man außerdem auf einem Substrat den Abstand der Proteinpunkte gemäß einem Gradienten, kann eine gerichtete Zellmigration zu Bereichen mit geringeren Abständen der Proteinpunkte beobachtet werden [211].

Zusätzlich zum Aspekt der geometrischen Verteilung von Proteinen werden einer Zelle in einer physiologischen Umgebung mehrere Liganden gleichzeitig präsentiert. Hierfür wurde eine spezielle Variante des *microcontact printings* entwickelt, die direktes Proteinstempeln ($d\mu$ CP) genannt wird. Dabei wird ein erstes Protein in einer gewünschten geometrischen Verteilung auf ein Substrat gestempelt. Die freien Bereiche zwischen dem Proteilmuster werden nun nicht passiviert, sondern mit einem zweiten Protein funktionalisiert. Dadurch erhält man ein Substrat mit zwei verschiedenen Proteinen, die räumlich getrennt voneinander vorliegen. Es handelt sich also um ein strukturiertes, differenzielles Proteinsubstrat. Mit dieser Art von Substrat lassen sich interessante Fragestellungen - vor allem im Bereich der Zell-Matrix Kontakte - adressieren. Die meisten Integrine sind nämlich nicht nur spezifisch für einen Liganden, sondern sie können mehrere Liganden binden. Differenzielle Proteinsubstrate bieten daher ein ideales Setup, um die Ligandenbindung eines bestimmten Integrins zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wird vor allem die Frage adressiert wie α V β 3-Integrin zwischen seinen verschiedenen Liganden „entscheidet“ und welche molekulare Mechanismen der differenziellen Ligandenbindung zugrunde liegen.

1.12 ZIELSETZUNG

Seit der Entdeckung der Integrine in den 80er Jahren wurden in vielzelligen Organismen bisher 24 funktionell unterschiedliche Integrin-Rezeptoren identifiziert. Während einige Integrine eine recht hohe Selektivität für einen bestimmten extrazellulären Liganden aufweisen, ist $\alpha V\beta 3$ -Integrin eines der promiskuitivsten Integrine. Ursprünglich wurde dieses Integrin als „der Vn-Rezeptor“, beschrieben [31]. Mittlerweile ist seine Funktion als Rezeptor für weitere Liganden wie z.B. Fn, Opn, Fbg oder Tsp anerkannt [44, 45, 212–215]. Diese Studien wurden allerdings größtenteils auf homogen beschichteten Zellkultursubstraten durchgeführt. Dies bedeutet, dass einer Zelle nur ein einzelner Ligand präsentiert wird. Folglich kann keine Aussage getroffen werden ob $\alpha V\beta 3$ -Integrin zwischen verschiedenen Liganden unterscheiden kann oder nicht. Eine solche Fragestellung wäre aber insofern interessant, da in einer *in vivo* Situation zum einen mehrere Liganden von $\alpha V\beta 3$ -Integrin gleichzeitig präsentiert werden. Zum anderen werden alle diese Liganden über das gleiche Erkennungsmotiv gebunden. Bisher ist aber noch vollkommen unklar ob (i) und wie (ii) $\alpha V\beta 3$ -Integrin zwischen dieser Vielzahl an extrazellulären Liganden „entscheidet“.

Um der physiologischen Situation mit einer komplexen ECM einen Schritt näher zu kommen, sollen in dieser Arbeit differenzielle Proteinsubstrate eingesetzt werden, die zwei Proteine gleichzeitig, räumlich getrennt und in subzellulärer Auflösung präsentieren. In einem solchen Setup kann $\alpha V\beta 3$ -Integrin zwischen zwei Liganden „entscheiden“. Konkret sollen in dieser Arbeit folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- (i) Bindet $\alpha V\beta 3$ -Integrin seine Liganden Fn, Vn, Opn, Fbg bzw. Tsp nach dem Prinzip „wer zuerst kommt, mahlt zuerst“ oder zeigt sich eine Präferenz für bestimmte Liganden?

- (ii) Kann eine Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin an verschiedene Liganden durch intrazelluläre Regulationsmechanismen (mechanische Kraft?) oder durch Regulation auf Integrin Ebene (Integrin-Konformation?) kontrolliert werden?

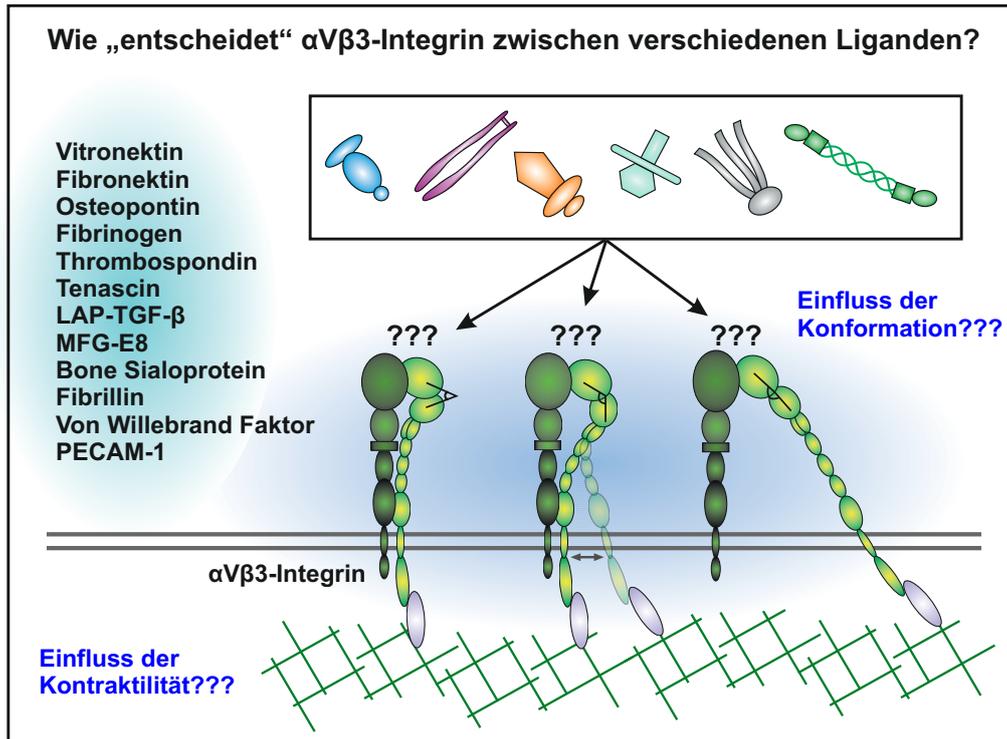


Abbildung 1.5: **Wie reguliert $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin welcher Ligand gebunden wird?** $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin gehört zu den promiskuitivsten Integrin-Rezeptoren und erkennt mindestens 12 verschiedene Liganden. In einem Gewebe sind Zellen von einer komplexen 3D-Matrix aus extrazellulären Proteinen umgeben. Dies bedeutet, dass in einer physiologischen Umgebung mehrere Liganden von $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin gleichzeitig präsentiert werden. Bisher ist aber kaum verstanden wie dieses Integrin „entscheidet“ welcher Ligand gebunden wird. In dieser Arbeit soll zum einen überprüft werden ob $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin seine Liganden Fn, Vn, Opn, Fbg bzw. Tsp mit unterschiedlicher Affinität bindet oder ob bestimmte Liganden präferiert gebunden werden. Zum anderen sollen mögliche Regulationsmechanismen der differentiellen Ligandenbindung aufgedeckt werden. Konkret liegt der Fokus vor allem auf dem Einfluss der intrazellulären Kontraktivität sowie der Rolle der Integrin-Konformation in diesem Prozess.

2

Kapitel 2

MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 CHEMIKALIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN

Tabelle 2.1: Verwendete Lösungsmittel, Chemikalien und andere Labormaterialien.

Name	Details	Hersteller
2-Propanol		Roth # 6752.2
Ampicillin Natriumsalz	100 µg/ml	Sigma Life Sciences # 8351
Agar-Agar, Kobel	15 g/l	Roth # 5210.3
β-Mercaptoethanol		Roth # 4227.1
Biosensoren (Ni-NTA)		ForteBio # 733-2142
Blebbistatin	10 µM	Sigma Aldrich# B0560
<i>Bovine serum albumin</i> /BSA	1 mg/ml	Thermo Scientific # 23209
Calciumchlorid		Roth # 5239.2
Calciumcarbonat		Roth # P012.1
Cilengitide	20 µM	Selleckchem # 57077
1,4-Dithiothreitol (DTT)	1 mM, 10 mM	Sigma Aldrich # 10197777001
Entsalzungssäulen PD10		GE Healthcare # 17-0851-01
Ethanol Rotipuran	99.8 %	Roth # 9065.5
<i>Fetal calf serum</i> /FCS	10 % v/v in DMEM	HyClone # SH30541.03
Glycin		Roth # 3908.3
Hefeextrakt	5 g/L	Roth # 2363.3
HEPES Pufferan	> 99 % p.a.	Roth # 9105.3

...

Name	Details	Hersteller
Kanamycin Sulphat	100 µg/ml	Carl Roth # T832.2
L-Glutamin		Life Technologies # 25030-024
Lipofectamine2000		Thermo Fisher # 11668019
Magnesiumchlorid Hexahydrat	1 mM	Roth # 2189.1
Manganchlorid Tetrahydrat	1 mM	Roth # 0276.2
Methanol		Merck # 1060092500
Natriumchlorid	10 g/l	Merck # 6400
Skim Milchpulver	5 % w/v	Fluka Analytical # 70166
Stickstoff	Reinheit 5.0	Linde
Mowiol	20 %	Merck # 475904
n-Propylgallat	1% in Mowiol	Sigma Aldrich # P-3130
Objektträger	76 x 26 mm	Roth # H868
Paraformaldehyd/PFA	4 % in PBS	Merck # 1040051000
Penicillin/Streptomycin	4 % in PBS	Sigma Aldrich # P-0781
Pepton aus Casein	10 g/l	Roth # 8952.2
Plasmid QIAprep Spin Miniprep Kit		Quiagen # 27106
Polydimethylsiloxan Sylgard 184	1:9	Dow Corning # (400)000105989377
Protein Labeling Kit (Alexa Fluor 568/647)	Alexa 568 für rhVn; Alexa 647 für bFn/hFbg	Life technologies # A20173
Tris(hydroxymethyl) aminomethan		Roth # 4855.2
TritonX-100	0.1 % in PBS	Roth # 6243051.4
Trypsin/EDTA	1:5 in PBS	Life Technologies # 15400-054
Trypsin Inhibitor	0.5 mg/ml	Sigma Aldrich # T6522
Tween-20	0.02 %	Roth # 9127.1

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Medien, Puffer und Lösungen.

Name	Details	Hersteller
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	4.5 g/l Glucose, L-Glutamin, Natriumpyruvat, 3.7 g/l NaHCO ₃	PAN Biotech # P04-03590
F12-Medium	<i>F12 nutrient mixture</i> 10 % fetales Kälberserum 1.167 g/l NaHCO ₃ 146 mg/l L-Glutamin 10 U/ml Pen/Strep	Sigma Aldrich # N6760 Merck # S0615 Thermo Fisher # 16110
Integrin Puffer	20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4, 1mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 0.02 % Tween-20, 0.1 % BSA, 0.1 % Triton-X 100	Eigenherstellung
LB-Medium	10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid	Eigenherstellung
Mowiol Einbettmedium	20 % Mowiol, 33.3 % Glycerin, n-Propylgallat, in PBS, pH 8 - 8.5	Eigenherstellung
OptiMEM	n/a	Life technologies # 11058021
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	Phosphat-gepufferte Salzlösung, 1x, ohne Ca ²⁺ , ohne Mg ²⁺	Pan Biotech # P04-36500
Paraformaldehyd (PFA) Fixierlösung	4 % PFA in PBS, pH 7.4	Eigenherstellung

2.1.2 PLASMIDE, ANTIKÖRPER UND AFFINITÄTSMARKER

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Fluoreszentes Protein	Herkunft
α -actinin1	mCherry	Addgene # 54975
β 3-N305T	EGFP	Bernhard Wehrle-Haller, Genf
β 3-V80C/D241C	EGFP	Bernhard Wehrle-Haller, Genf
β 3-wt	EGFP	Bernhard Wehrle-Haller, Genf
NMIIA	mapple	Addgene # 54929
Vinculin	mCherry	Christoph Ballestrem, Manchester

Tabelle 2.4: Verwendete Primärantikörper. Die eingesetzte Verdünnung erfolgt in 1 % BSA in PBS.

Antigen	Typ	Organismus	Firma	Verdünnung
β 1-Integrin	IgG mkl	Ratte	BD Biosciences # 553715	1:50
Fibrinogen	IgG pkl	Kaninchen	Abcam # ab34269	1:200
His-Tag	IgG pkl	Kaninchen	Abcam # ab1187	1:200
Osteopontin	IgG pkl	Kaninchen	Gene Tex # GTX37582	1:100
Paxillin	IgG mkl	Maus	BD Transduction # 610052	1:500
Vitronektin	IgM mkl	Maus	Sigma Aldrich # V7881	1:1000

Tabelle 2.5: Verwendete Sekundärantikörper. Die eingesetzte Verdünnung erfolgt in 1 % BSA in PBS.

Spezies	Reaktivität	Typ	Organismus	Firma	Verdünnung
Kaninchen	IgG	Cy3	Ziege	Dianova # 111-165-003	1:200
Maus	IgM	Cy3	Ziege	Dianova # 115-166-075	1:200
Maus	IgG	Cy3	Ziege	Jackson Immunoresearch # 115-165-146	1:200
Ratte	IgG	Alexa Fluor 488	Ziege	Thermo Fisher # A11006	1:200

Tabelle 2.6: Verwendete Affinitätsmarker. Die eingesetzte Verdünnung erfolgt in 1 % BSA in PBS.

Reagenz	Marker	Firma	Verdünnung
Phalloidin AlexaFluor 488	Aktin	Invitrogen # A12379	1:200
Phalloidin AlexaFluor 647	Aktin	Invitrogen # A22287	1:200
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	DNA	Roth # 6335	1:2000

2.1.3 PROTEINE

Für die Oberflächenbeschichtung der homogenen bzw. differenziellen Zellkultursubstrate wurden folgende ECM-Proteine verwendet

Tabelle 2.7: Liste verwendeter Proteine.

Name	Stock Konzentration	Hersteller
humanes rekombinantes α V β 3-Integrin	rekombinant exprimiert in CHO-Zellen. Stock 100 μ g/ml	RnD Systems # 350-AV
<i>Bovine Serum Albumine</i> /BSA	1 % w/v gelöst in PBS	Sigma-Aldrich # A3059

...

Name	Stock Konzentration	Hersteller
humanes Fibrinogen/hFbg	aus humanem Plasma; gelöst in <i>citrate buffered saline</i> (CBS) Stock 1.25 mg/ml	Bio-Rad # 4440-8604
bovines Fn/bFn (für Fluoreszenzmarkierung)	aus bovinem Plasma; Lyophilisat in ddH ₂ O	Sigma-Aldrich # F4759
humanes Fibronectin/hFn	aus humanem Plasma; Lyophilisat in ddH ₂ O; Stock 1 mg/ml	Sigma Aldrich # F2006
bovines Osteopontin/bOpn	aus der bovinen Milch; Lyophilisat in PBS Stock 50 µg/ml	Sigma-Aldrich # O3514
rekombinantes humanes Thrombospondin/hThs	rekombinant exprimiert in einer Maus Myeloma Linie Lyophilisat in <i>tris buffered saline</i> (TBS) Stock 100 µg/ml	R&D Systems # 3074-TH-050
humanes Vitronectin/hVn	aus humanem Plasma; Lyophilisat in PBS; Stock 50 µg/ml	Sigma-Aldrich # V8379
rekombinantes humanes Vitronectin/rhVn	rekombinant exprimiert in HEK 293; Lyophilisat in PBS Stock 250 µg/ml	Sigma-Aldrich # SRP3186

2.1.4 MIKROSKOPE, OBJEKTIVE UND SOFTWARE

Tabelle 2.8: Übersicht der verwendeten Mikroskope und Objektive.

Mikroskop	Beschreibung
Apotom Imager Z1, Carl Zeiss	aufrechtes Mikroskop, Plan Apochromat 63x/1.4 Ölimmersion
Elyra PS. 1, Carl Zeiss	inverses Fluoreszenzmikroskop für hochauflösende Mikroskopie Plan Apochromat 63x/1.4 Ölimmersion,

...

Mikroskop	Beschreibung
LSM 800 mit Airyscan, Carl Zeiss	inverses Mikroskop, Plan Apochromat 63x/1.4 Ölimmersion

Tabelle 2.9: Übersicht der verwendeten Software.

Software	Hersteller
ZEN 2010D	Carl Zeiss
Corel Draw X3 bzw. Corel Draw X7	Corel
Image J	Wayne Rasband
Microsoft Office 2010	Microsoft
Origin Pro 2016G	Originlab

2.2 SUBSTRATHERSTELLUNG

Für diese Arbeit wurden sowohl homogen beschichtete Substrate als auch mikrostrukturierte, differenzielle Proteinsubstrate verwendet. Die differenziellen Substrate wurden mithilfe des direkten Proteinstempels ($d\mu$ CP) hergestellt. Damit können zwei Proteine gleichzeitig, sauber getrennt und in subzellulärer Auflösung auf einem Substrat präsentiert werden. Durch Kombination verschiedener ECM-Proteine können Substrate mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung hergestellt werden. Prinzipiell war diese Methode im Labor bereits etabliert [216]. Die Qualität und Reproduzierbarkeit des Proteinmusters wurde in dieser Arbeit weiterentwickelt.

2.2.1 HOMOGEN BESCHICHTETE PROTEINSUBSTRATE

Zur Herstellung homogen beschichteter Substrate wurden Deckgläser eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit dem gewünschten Protein beschichtet. Für alle Proteine wurde eine Konzentration von 10 μ g/ml eingesetzt. Anschließend wurden die Deckgläser mit 1x PBS gewaschen und für die Zelleexperimente verwendet.

2.2.2 DIFFERENZIELLE PROTEINSUBSTRATE: STEMPELMUSTER

Mithilfe des direkten Proteinstempels können strukturierte Substrate mit verschiedener Geometrie hergestellt werden. Die gewünschten Strukturen können sowohl in Form als auch Größe variieren. Dies verleiht der Methode hohe Flexibilität für verschiedene biologische Fragestellungen. So können beispielsweise Strukturen zellulärer Größe wie Quadrate oder Kreuze hergestellt werden, auf denen die gesamte Zelle adhären kann. Es können aber auch Strukturen subzellulärer Größe gestempelt werden. In diesem Fall stehen einer Zelle also nur vereinzelte Proteinspots für eine Adhäsion zur Verfügung. Die Erfahrungen zeigen, dass man allerdings einer Auflösungsgrenze unterliegt. Demnach können beispielsweise Quadrate mit einer Kantenlänge von einem μm noch hergestellt werden. Für kleinere Strukturen ist diese Methode nicht mehr geeignet. Für die Fragestellung dieser Arbeit wurde ein Quadratmuster subzellulärer Größe ausgewählt. Die einzelnen Quadrate zeigen eine Größe von $2.5 \mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m}$. Der Abstand zwischen den einzelnen Quadraten beträgt $1.5 \mu\text{m}$. Mit dieser Geometrie liegt die Gesamtfläche der Quadrate auf dem Substrat bei etwa 50 %. Umgekehrt beträgt die freie Fläche zwischen den Quadraten ebenfalls etwa 50 %. Im Prozess des direkten Proteinstempels wird ein erstes Protein als Quadratmuster auf das Substrat gestempelt. Die freien Bereiche zwischen dem Proteinmuster werden mit einem zweiten Protein geflutet. Das zweite Protein adsorbiert ausschließlich an die Bereiche zwischen dem Quadratmuster. Somit lässt sich eine 50/50 Verteilung beider Proteine auf einem Substrat erreichen.

2.2.3 HERSTELLUNG DER STEMPEL

Für das direkte Proteinstempeln sind spezielle Stempel notwendig, die aus einer Master-Vorlage abgeformt werden. Der verwendete Master muss das inverse topographische Muster der gewünschten Stempelstruktur aufweisen. In dieser Arbeit wurden Silizium-Master verwendet, die mittels Elektronenlithographie von Dr. Ralph Bubeck (Universität Konstanz) hergestellt wurden. Diese Master enthalten das inverse topographische Muster des oben beschriebenen Quadratmusters. Im Prozess der Stempelherstellung wird das inverse Muster des Masters auf PDMS übertragen. Dadurch erhält man das gewünschte Quadratmuster als PDMS-Abdruck. Das PDMS wird in einem Verhältnis von 9:1 mit Härter vermischt und anschließend auf den Silizium Master gegeben. Ein Glasstreifen (ca. 1 cm breit) wird auf dem PDMS-Tropfen positioniert und mit einem Messingblock beschwert. Dadurch wird das PDMS homogen entlang des Glasstreifens verteilt. Die Polymerisierung des PDMS erfolgt über Nacht bei 60°C . Das polymerisierte PDMS und auch der Glasstreifen werden schließlich passend zugeschnitten und auf einen Kunststoffblock geklebt, der als Griff dient.

2.2.4 REINIGUNG DER STEMPEL

Die Stempel werden vor und nach jeder Nutzung gereinigt. Vorsichtiges Ankleben und Abziehen eines Klebestreifens entfernt rückständige Proteinreste. Dies erfolgt ohne Druck, um die Struktur des PDMS-Stempels nicht zu schädigen. Anschließend werden die Stempel für etwa 2 Minuten mit 99.8 % EtOH inkubiert. Dies entfernt Rückstände des Klebefilms. Nach diesen Schritten sind die Stempel für eine erneute Nutzung gereinigt.

In regelmäßigen Abständen erfolgte auch eine Reinigung im Ultraschallbad, um intensive Verschmutzungen zu entfernen. Dafür wurden die Stempel in Bechergläser gefüllt mit 99.8 % EtOH gelegt und für 15 Minuten im Ultraschallbad gereinigt.

2.2.5 DIREKTES PROTEINSTEMPELN

Bei dem Verfahren des direkten Proteinstempeln wird der Stempel direkt mit einer Proteinlösung inkubiert. Dieses erste Protein wird gemäß der Topographie des Stempels auf ein Deckglas übertragen. Die gestempelte Struktur wird anschließend mit einer zweiten Proteinlösung überschichtet. Bei allen getesteten Proteinkombinationen dieser Arbeit adsorbierte das zweite Protein ausschließlich an die freien Bereiche zwischen dem Stempelmuster. Damit konnte eine saubere Trennung von zwei verschiedenen Proteinen auf einem Substrat erreicht werden. Das Prinzip des direkten Proteinstempeln ist in Abbildung 2.1 (a) dargestellt. Das verwendete Stempelmuster und die Trennung beider Proteine auf einem Substrat sind in Abbildung 2.1 (b) gezeigt.

Nach der Reinigung der Stempel wurde die erste Proteinlösung auf die Struktur des Stempels gegeben. Erfahrungen der Arbeitsgruppe zeigten, dass hohe Konzentrationen an Protein zu einem gleichmäßigerem Übertrag des ersten Proteins führen [217, 218]. Um dies zu gewährleisten wurde ein Mix aus aktivem (5 µg/ml) und inaktivem (45 µg/ml) Protein eingesetzt. Inaktivierung erfolgte mittels thermischer Denaturierung bei 95 °C. Dadurch konnte eine hohe Konzentration an Protein für den Stempelprozess erreicht werden. Gleichzeitig wurde den Zellen in den Experimenten keine übermäßig hohe Konzentration an aktivem Protein präsentiert. Zur Visualisierung der gestempelten Struktur wurde der Proteinlösung eine Fraktion an Alexa647-markiertem Protein im Verhältnis von 1:40 beigemischt. Insgesamt wurde diese Proteinlösung für 10 Minuten auf der Stempelstruktur inkubiert. Anschließend wurde der Stempel mit Stickstoff getrocknet. Ein gereinigtes Deckglas (99.8 % EtOH) wurde auf der Stempelfläche positioniert und mit einer Pinzette vorsichtig auf die Stempelstruktur gedrückt. Interferenzfarben sind dabei ein Indiz für den engen Kontakt zwischen Stempelfläche und Deckglas. Der Druck durfte allerdings nicht zu groß sein, da dies sonst zu einem

Kollabieren der Stempelstruktur führt. Der Übertrag des ersten Proteins an Glasbereiche erfolgt gemäß der Topographie des Stempelmusters. Im Falle dieser Arbeit wurden also nur die hervorstehenden quadratischen Strukturen auf das Deckglas übertragen. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurde das Deckglas vom Stempel gelöst. Der gestempelte Bereich wurde schließlich mit einer zweiten Proteinlösung (5 µg/ml) überschichtet. Dies entspricht der Konzentration der aktiven Fraktion des ersten Proteins. Das zweite Protein wurde für eine Stunde bei RT inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte die Adsorption an die freien Bereiche zwischen dem gestempelten Muster. Um die zweite Proteinlösung zu entfernen wurden die Substrate mit 1x PBS gewaschen. Anschließend waren die differenziellen Substrate für die Zellaussaat bereit.

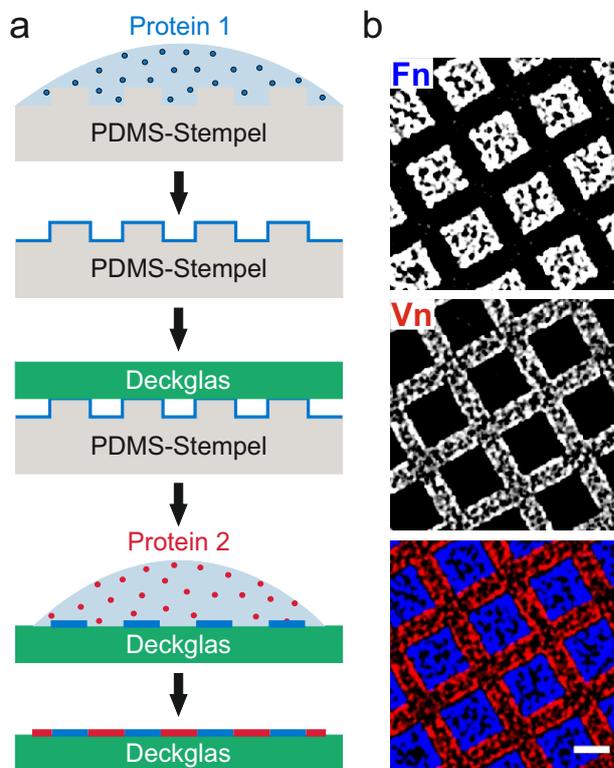


Abbildung 2.1: Verfahren des direkten Proteinstempelns

(a) Das direkte Proteinstempeln ist eine Methode zur Herstellung von strukturierten Substraten mit zwei verschiedenen Proteinen. Die Struktur eines PDMS-Stempels wird dabei mit einer ersten Proteinlösung beschichtet. Im nächsten Schritt wird dieses Protein gemäß der Topographie des Stempels auf ein Deckglas übertragen. Die gestempelte Struktur wird schließlich mit einer zweiten Proteinlösung überschichtet. Das zweite Protein adsorbiert ausschließlich an die freien Bereiche zwischen dem Stempelmuster.

(b) Fluoreszenzaufnahmen des gestempelten Quadratmusters (2.5 µm x 2.5 µm). Alexa-647 markiertes Fn (blau) und immunhistochemisch visualisiertes Vn (rot) liegen sauber getrennt auf einem Substrat vor (Maßstab: 2 µm).

2.3 ZELLKULTUR UND ZELLEXPERIMENTE

Für die Zelleexperimente dieser Arbeit wurde eine Subpopulation der Mausfibroblastenzelllinie NIH 3T3 Zellen verwendet. Diese Subpopulation weist ein niedriges Level an endogenem β 3-Integrin auf (ca. 1 %) [216]. Die Zelllinie wird daher als 3T3low bezeichnet. Die Selektion

der Zellen nach einem geringen Level an endogenem $\beta 3$ -Integrin erfolgte durch *fluorescence-activated cell sorting* (FACS). Die Zellen wurden in einer Kollaboration von Bernhard Wehrle-Haller (Universität Genf) bereitgestellt.

2.3.1 ROUTINE ZELLKULTUR

Die 3T3low Zellen wurden in 1x DMEM mit zusätzlich 10 % FCS unter Standardbedingungen kultiviert (37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre, 98 % Luftfeuchtigkeit). Die Zellen wurden 3x pro Woche passagiert. Für die Passage wurden Zellen mit 1x PBS (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA behandelt. Dadurch wurde ein Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche (Greiner, 25 cm²) erreicht. Die Trypsinierung wurde nach 2-4 Minuten durch Zugabe von DMEM + 10 % FCS gestoppt. Die Zellen wurden schließlich in ein Falcon überführt und 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in DMEM + 10 % FCS aufgenommen. Je nach gewünschtem Verdünnungsverhältnis wurde ein Teil der Mutterkultur in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt. Eine erneute Wachstumsphase erfolgte im Inkubator unter Standardbedingungen.

2.3.2 TRANSFEKTION VON ZELLEN: LIPOFEKTION

Eine transiente Transfektion von Zellen wurde mithilfe der Lipofektion erreicht. Über Plasmide kann dadurch ein gewünschtes Genkonstrukt in die Zelle eingebracht werden, an das ein fluoreszentes Protein gekoppelt ist. Dieses Genkonstrukt wird während der Zellteilung in den Kern aufgenommen wo es schließlich transkribiert wird [219]. In dieser Arbeit wurden 3T3low Zellen mit $\beta 3$ -wt Integrin bzw. mit verschiedenen Mutanten von $\beta 3$ -Integrin transfiziert (s. Tab. 2.3). Diese Zelllinie exprimiert - wie oben erwähnt - ein sehr geringes Level an endogenem $\beta 3$ -Integrin. Durch zusätzliche Expression nach Transfektion werden zum einen Überexpressionsartefakte vermieden. Zum anderen kann der spezifische Effekt einer Integrin-Mutation in diesem System untersucht werden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die $\beta 3$ -Untereinheit neben der αV -Untereinheit nur noch mit einer weiteren α -Untereinheit ein Heterodimer bilden kann. Dieses Integrin wird $\alpha I I b \beta 3$ -Integrin genannt. Dabei handelt es sich um ein Thrombozyten-spezifisches Integrin, das in den verwendeten 3T3low Zellen nicht exprimiert wird. Demnach ist die Lokalisation der GFP-gekoppelten $\beta 3$ -Integrin Konstrukte dieser Arbeit spezifisch für $\alpha V \beta 3$ -Integrin.

Für die Lipofektion wurden Zellen bis etwa 70 % Konfluenz kultiviert. Dies ist wichtig, um Proliferation der Zellen zu gewährleisten. Das verwendete Plasmid kann nur während der Zellteilung aufgenommen werden, wenn die Kernmembran aufgelöst wird. Als Trans-

fektionsreagenz wurde Lipofectamine 2000 verwendet. In zwei getrennten Ansätzen wurde OptiMEM mit Lipofectamine 2000 bzw. mit 2.5 - 5 μg der gewünschten Plasmid-DNA vermengt. Für alle Integrin-Konstrukte wurde 2.5 μg DNA eingesetzt. Für das CMA-Protein Vinculin wurde 5 μg DNA verwendet. Beide Ansätze wurden 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend vermengt. Nach einer weiteren Inkubation von 30 - 60 Minuten wurde der Lipofectamine/Plasmid Mix zu den 3T3low Zellen in das Medium gegeben. Nach 12-16 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 48 Stunden Expressionsdauer wurden die transfizierten Zellen für die Zellexperimente verwendet.

2.3.3 ZELLEXPIMENTE AUF PROTEINSUBSTRATEN

Die Zellexperimente auf den homogen beschichteten bzw. differenziellen Proteinsubstraten wurden in Abwesenheit von Serum im Medium durchgeführt. Dies verhindert eine Überlagerung der spezifisch beschichteten Substratoberfläche mit Serumproteinen. Prinzipiell wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben abgelöst. Die Trypsinierung wurde allerdings mit einem Trypsin Inhibitor abgestoppt. Dies erlaubt in weiteren Schritten ein sehr sauberes Arbeiten ohne Serumproteine. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in DMEM ohne Serum aufgenommen und in einer definierten Zellzahl auf die entsprechenden Substrate gegeben. Für homogen beschichtete Substrate wurden 80000 Zellen und für differenzielle Substrate 150000 Zellen eingesetzt. Die Zellkultursubstrate wurden vorher in 12-well Platten vorgelegt und ebenfalls mit Medium ohne Serum überschichtet. Wenn nicht anders angegeben wurden Zellen für 2 Stunden auf den Zellkultursubstraten unter Standardbedingungen kultiviert.

In einigen Experimenten wurden Zellen mit pharmakologischen Inhibitoren bzw. zweiwertigen Kationen behandelt. Dafür wurden Zellen wie oben beschrieben abgelöst und auf die Proteinsubstrate ausgesät. Die verwendete Konzentration der einzelnen Komponenten und die Dauer der Behandlung ist in Tab. 2.10 aufgelistet.

Tabelle 2.10: Behandlung von Zellen mit pharmakologischen Inhibitoren bzw. zweiwertigen Kationen.

Behandlung	Dauer der Behandlung	Konzentration
Blebbistatin	2 Stunden	10 μM
Ca^{2+}	Zugabe 30 Minuten vor Fixierung	1 mM
DTT	Zugabe 15 Minuten vor Fixierung	1 mM bzw. 10 mM
Mn^{2+}	Zugabe 30 Minuten vor Fixierung	1 mM

2.3.4 ZEITRAFFERAUFNAHMEN

Für Zeitrafferaufnahmen wurden Zellen wie in 2.3.3 abgelöst und nach der Zentrifugation in F12 Medium ohne Phenolrot aufgenommen. Die differenziellen Substrate wurden in magnetische Deckglashalter (Institut für angewandte Physik, KIT, Werkstatt) eingespannt und mit F12 Medium überschichtet (37 °C). Das verwendete Elyra PS.1 wurde für mindestens 2 Stunden auf 37 °C vorgewärmt. Für die Lebendzelleexperimente wurde ein Bild pro Minute aufgenommen. Das Elyra PS.1 ist ein Prototyp und verfügt über keine automatisierte Zeitreihenfunktion mit mehreren Kanälen. Daher wurde für jeden Kanal manuell ein Bild aufgenommen. Der manuelle Kanalwechsel führte zu einem zeitlichen Versatz von etwa 5 Sekunden pro Kanal.

2.4 IMMUNHISTOCHEMIE

Für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurden die Proben in eine abgedunkelte, feuchte Kammer gelegt. Im ersten Schritt wurden die Zellen auf dem Substrat für 10 Minuten mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3x für 5 Minuten mit 0.1 % Triton X-100 in 1x PBS gewaschen. Dies bewirkt eine Permeabilisierung der Zellmembran. Die primären Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen von Interesse wurden in 1x PBS + 1 % BSA angesetzt und auf die Proben gegeben (Verdünnung siehe Tab. 2.4). Nach einer einstündigen Inkubation bei RT wurden die Proben erneut 3x für 5 Minuten mit 0.1 % Triton X-100 in 1x PBS gewaschen. Dies entfernt unspezifisch gebundene Antikörper. Die sekundären Antikörper wurden ebenfalls in 1x PBS + 1 % BSA (Verdünnungen siehe Tab. 2.5) angesetzt und auf die Proben gegeben. Wurden zusätzlich Affinitätsmarker (siehe Tab. 2.6) eingesetzt, erfolgte dies in einem Schritt mit den sekundären Antikörpern. Es folgte erneut eine einstündige Inkubation bei RT und ein anschließender Waschschrift. Die gefärbten Proben wurden schließlich in einer Mowiol Lösung auf einem Objektträger eingebettet.

2.5 MOLEKULARDYNAMIK (MD) SIMULATIONEN

Die Molekuldynamik-Simulationen wurden an der Universität Tampere (Finnland) von Vasyly Mykuliak durchgeführt. Für die Simulationen wurde die Kristallstruktur von $\alpha V\beta 3$ -Integrin gebunden an ein Fragment des Fn-Moleküls verwendet. Dabei handelt es sich um die RGD enthaltene Fibronectin TypIII Domäne an Position 10 (FnIII₁₀). Die Kristallstrukturen entstammen der RCSB Protein Datenbank (PDB). Für die MD Simulationen wurde die FnIII₁₀-gebundene Struktur von $\alpha V\beta 3$ -Integrin (PDB: 4MMX) verwendet und

durch Überlagerung mit der β A- und Hybrid Domäne einer geöffneten Integrin Struktur (PDB: 3ZE1) wurde ein *Swing-out* der Hybrid Domäne eingerichtet. Diese Auslenkung der Hybrid Domäne entspricht einer intermediären Integrin Konformation (Schritt 7) wie sie von Zhu und Kollegen publiziert wurde [129]. Diese Struktur wurde schließlich durch eine Glykosylierung an Position N303 modifiziert. Dieselbe Struktur ohne Glykosylierung wurde als Kontrolle verwendet. Die Simulationen wurden mithilfe von Gromacs 2016.1 am Sisu Supercomputer (CSC Finland) durchgeführt.

2.6 BIO-LAYER INTERFEROMETRIE

Die Bio-Layer Interferometrie (BLI) ist eine markierungsfreie, optische Technik, um die Kinetik von Protein-Protein Interaktionen in Echtzeit zu untersuchen [220, 221]. Dabei werden faseroptische Biosensoren genutzt, die an der Spitze mit einer biokompatiblen Matrix beschichtet sind. Die biokompatible Matrix kommerzieller Biosensoren ist wiederum mit sogenannten Fängermolekülen wie Streptavidin, Protein A oder Ni-NTA beschichtet. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Ni-NTA Biosensoren verwendet, um his-getaggte Biomoleküle spezifisch an den Biosensor zu koppeln. Dadurch kann eines der beiden Zielmoleküle, für das eine Interaktion untersucht werden soll, spezifisch an den Biosensor gebunden werden. Anschließend wird der Biosensor in eine Proteinlösung gegeben, die den potenziellen zweiten Bindungspartner enthält. BLI analysiert das Interferenzmuster von weißem Licht, das an der Spitze des Biosensors von zwei optischen Grenzflächen reflektiert wird. Dabei handelt es sich um eine interne Referenzschicht und eine externe Schicht, die sich zwischen Sensoroberfläche und umgebender Lösung befindet. Bindung von Biomolekülen an den Biosensor verändert die Schichtdicke und damit die effektive Distanz der zweiten optischen Grenzfläche relativ zur internen Referenzschicht (Abb. 2.2 a). Dies führt letztendlich zu einer Veränderung des Interferenzmusters des reflektierten Lichtes, das an einem Photospektrometer detektiert wird (Abb. 2.2 b). Werden die Interferenzmuster prozessiert ergibt sich ein interferometrisches Profil, das je nach Anzahl gebundener Biomoleküle an den Biosensor in x-Richtung verschoben ist. Die resultierende Wellenlängenverschiebung $\Delta\lambda$ ist schließlich ein direktes Maß der Veränderung der optischen Schichtdicke (Abb. 2.2 c). Wird diese Veränderung der Schichtdicke bzw. des Interferenzmusters über einen längeren Zeitraum gemessen und als Funktion der Zeit aufgetragen, ergibt sich eine charakteristische Assoziations-/Dissoziationskurve.

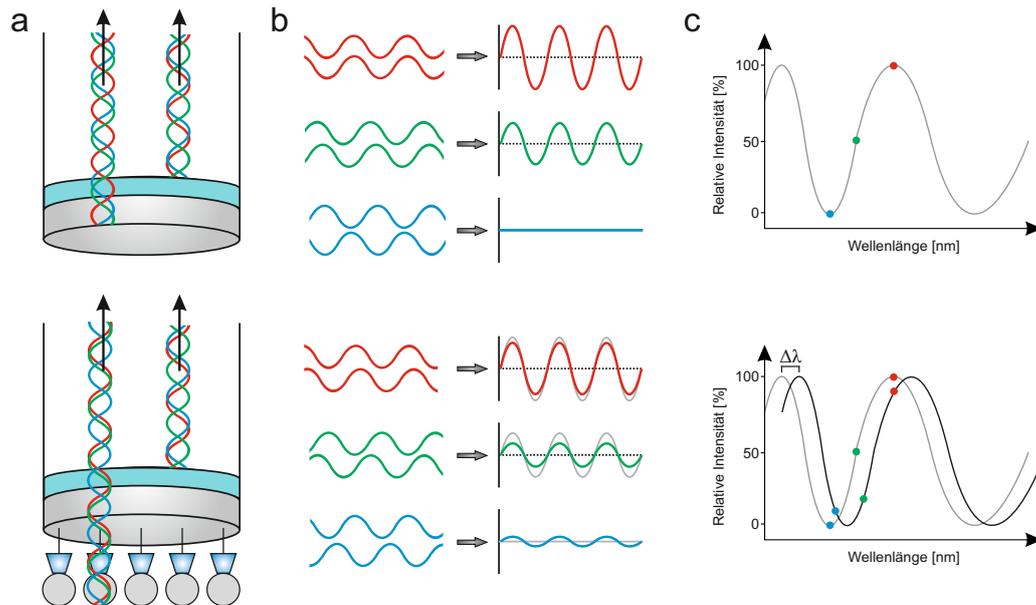


Abbildung 2.2: **Prinzip der Biolayer Interferometrie.** (a) An der Spitze des Biosensors sind zwei optische Grenzflächen zu erkennen: Eine interne Referenzschicht (cyan) und eine externe Schicht zwischen dem Ende der Sensoroberfläche (grau) und der umgebenden Lösung. Weißes Licht wird an beiden Grenzflächen reflektiert (obere Reihe). Binden Moleküle an die Spitze des Biosensors ändert sich die Schichtdicke und damit auch die Position der externen Referenzschicht relativ zur internen Referenzschicht (untere Reihe). (b) Interferenzmuster des reflektierten Lichtes ohne gebundene Biomoleküle (obere Reihe). Verändert sich die Schichtdicke an der Spitze des Biosensors resultiert dies in einem veränderten Interferenzmuster des reflektierten Lichtes. Die Amplitude der ursprünglichen Interferenz ohne gebundene Biomoleküle ist zum Vergleich als graue Linie dargestellt (untere Reihe). (c) Interferometrisches Profil ohne gebundene Biomoleküle (obere Reihe) bzw. nach Bindung von Biomolekülen an den Biosensor (untere Reihe). $\Delta\lambda$ zeigt die resultierende Wellenlängenverschiebung.

2.6.1 BLITZ ASSAY

Für die Messung von Protein-Protein Interaktionen in Echtzeit wurde das BLITZ Biolayer Interferometer (Pall ForteBio) verwendet. Alle Schritte während den Messungen wurden bei RT in einem Integrin Puffer durchgeführt. Die Ni-NTA Biosensoren wurden zuerst für 10 Minuten im Integrin Puffer prähydriert. Anschließend erfolgte ein Baseline Schritt (45s) im Integrin Puffer (Abb. 2.3 a). Dies war notwendig, um eine stabile Messkurve mit minimaler Drift zu erhalten. Danach wurde der Biosensor mit aufgereinigtem $\alpha V\beta 3$ -Integrin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beladen (180s). Die Bindung an den Ni-NTA Biosensor erfolgte über einen His-Tag am Integrin (Abb. 2.3 b). Nach der Ladephase erfolgte erneut ein Baseline Schritt (45s; Abb. 2.3 c). Für die Assoziationsphase (300s) wurde der Biosensor mit Fn oder Vn (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert (Abb. 2.3 d). Bei diesem Schritt findet eine Interaktion zwischen Integrin und

Ligand statt. Eine unspezifische Bindung des Liganden an freie Bereiche des Biosensors wurde experimentell ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Für die nachfolgende Dissoziation (250s) wurde der Biosensor in Integrin Puffer ohne Ligand überführt. Je nach Bindungsstärke der Integrin-Ligand Interaktion findet in diesem Schritt eine Dissoziation des Liganden statt (Abb. 2.3 e). Die gemessenen Bindungskurven wurden mithilfe einer Referenzkurve korrigiert. Die Referenzkurve wurde ohne Zugabe von Liganden erstellt, um eine unspezifische Bindung von Pufferkomponenten an den Biosensor und Drift des Systems zu berücksichtigen. Die Affinitätsgleichgewichtskonstante (K_D) wurde von der BLItz Software aus der Assoziationskonstante und der Dissoziationskonstante berechnet.

In einem Kontrollexperiment wurde während der Dissoziationsphase 20 μM Cilengitide in Integrin Puffer gegeben. Bei diesem Experiment wurde zwischen Assoziations- und Dissoziationsphase ein Baseline Schritt von 10 Sekunden eingefügt.

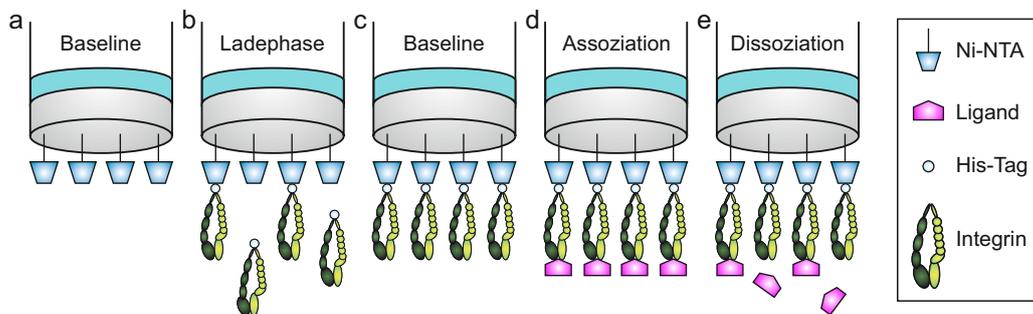


Abbildung 2.3: **Einzelschritte des BLItz Assay.** (a) Ein Ni-NTA Biosensor wird für einen Baseline Schritt in Integrin-Puffer überführt. (b) In einer Ladephase bindet $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin an den Biosensor. Die Bindung erfolgt über einen His-Tag an den Ni-NTA Biosensor. (c) Ein Baseline Schritt etabliert vor der Assoziation eine stabile Messkurve mit minimaler Drift. (d) Integrin-beladener Biosensor wird in Integrin Puffer mit Ligand von Interesse überführt. In diesem Schritt erfolgt die Integrin-Ligand Interaktion. (e) In der Dissoziationsphase wird der Biosensor in Integrin Puffer ohne Ligand überführt. Gemäß der Kinetik von Protein-Protein Interaktionen erfolgt eine Dissoziation des Liganden.

2.7 HOCHAUFLÖSENDE MIKROSKOPIE

Nach einer Definition von Ernst Abbé ist die Auflösung klassischer Fluoreszenzmikroskopie durch Beugung begrenzt. Demnach ist die Auflösung abhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lichts und dem Öffnungswinkel des Objektivs. Hochauflösende Mikroskopietechniken "sprengen" diese Begrenzungen und können die Auflösung in x-, y- und z-Richtung verbessern [222]. Im Fall von SIM wird eine Auflösungssteigerung um einen Faktor von 2

erreicht. Dementsprechend liegt die Auflösungsgrenze in x,y Richtung bei maximal 100 nm und die Auflösung in z-Richtung bei etwa 250 nm [223]. Vergleicht man SIM mit konventioneller Weitfeld-Mikroskopie können zelluläre Strukturen wie Integrin-vermittelte Adhäsionen mit deutlich verbesserter Auflösung abgebildet werden (Abb. 2.4). In dieser Arbeit wurde die Lokalisation von $\alpha V\beta 3$ -Integrin auf Fn/Vn Substraten untersucht. Die limitierte Auflösung konventionelle Weitfeld-Mikroskopie war nicht ausreichend, um zu bestimmen welcher Anteil von $\alpha V\beta 3$ auf Fn bzw. Vn lokalisiert. SIM dagegen ermöglichte eine Quantifizierung mit klar erhöhter Präzision.

Wie funktioniert eine solche Auflösungssteigerung aber? Das Grundprinzip von SIM basiert auf strukturierter Beleuchtung. Durch ein Gitter im Strahlengang wird ein sinusoidales Muster erzeugt, das mit der unbekanntes Probenstruktur (‘‘zweites Gitter‘‘) interferiert. Durch diese Interferenz kommt es zum Moiré Effekt und damit zur Entstehung eines ‘‘dritten Gitters‘‘ mit niedrigerer Frequenz und somit größeren Strukturen. Im Vergleich zu den beiden Ursprungsmustern ist dieses dritte Muster auflösbar und kodiert Informationen der Probenstruktur [223, 224]. Diese Informationen können schließlich mithilfe mathematischer Algorithmen aus den Frequenzdaten der optischen Transferfunktion und den Parametern der strukturierten Beleuchtung extrahiert werden [224, 225]. Bei dem resultierenden, hochaufgelösten SIM-Bild handelt es sich also um eine verrechnete Aufnahme. Trotz allen Verrechnungen ist SIM aber weitgehend anerkannt als hochauflösende Mikroskopie-Technik. Allerdings lassen sich nach den SIM-Verrechnungen keine Aussagen mehr über absolute Intensitäten treffen. Für diese Arbeit wurden Experimente mit Intensitätsmessungen daher mithilfe konventioneller Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

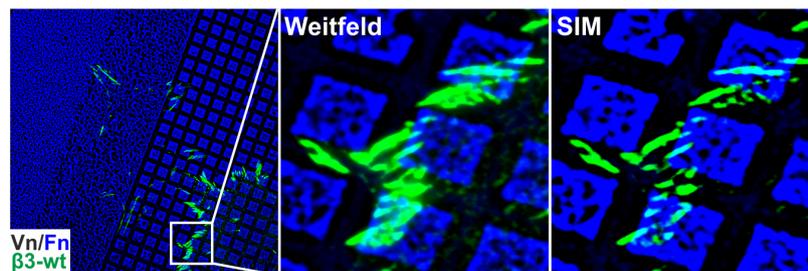


Abbildung 2.4: **Auflösungssteigerung durch SIM-Mikroskopie.** Vergleich von konventioneller Fluoreszenzmikroskopie und SIM am Beispiel Integrin-vermittelter Adhäsionen ($\alpha V\beta 3$ -Integrin) auf differentiellen Fn/Vn Substraten. Die SIM Aufnahmen zeigen eine deutlich verbesserte Auflösung der Integrin-vermittelten Adhäsionen. Außerdem kann mit erhöhter Präzision bestimmt werden welcher Anteil von $\alpha V\beta 3$ -Integrin auf Fn bzw. Vn lokalisiert.

2.8 BILDBEARBEITUNG UND QUANTIFIZIERUNG

Alle Bilder wurden mit der ZEN Software von Carl Zeiss aufgenommen. Bildbearbeitung erfolgte mit der Software Fiji [226]. Für alle repräsentativen Bilder wurde der Kontrast und die Helligkeit angepasst. Die Graphen für die Quantifizierung wurden mit Origin Pro 2016G erstellt. Alle Abbildungen wurden mit Corel Draw Graphic Suite X7 vorbereitet.

2.8.1 QUANTIFIZIERUNG AUF HOMOGEN BESCHICHTETEN SUBSTRATEN

Für die Auswertung der Intensität der β 3-Integrin vermittelten Adhäsionen auf homogen beschichtetem Substrat wurde bei der Bildaufnahme für jedes Bilde eine konstante Belichtungszeit verwendet (Apotom Imager Z1.: 700 ms; LSM 800: 650 ms, gain 700). Dies erlaubt Aussagen über unterschiedliche Intensitäten in den einzelnen Konditionen.

2.8.2 QUANTIFIZIERUNG AUF DIFFERENZIELLEN SUBSTRATEN

Für die Lokalisationsstudien auf den differenziellen Proteinsubstraten wurde jeweils die Kolo-kalisation von β 3-Integrin mit dem gestempelten Protein (Quadrate) quantifiziert. Es wurden ausschließlich β 3-Integrin Signale in den peripheren Adhäsionen ausgewertet, die mit Paxillin kolo-kalisiert. So wurde sichergestellt, dass ausschließlich funktionelle Adhäsionen ausgewertet werden. Um dies zu erreichen war eine Bildbearbeitung vor der Analyse nötig (Abb. 2.5). Zuerst wurde das β 3-Signal definiert, das für die Analyse verwendet werden soll. Hierfür wurde das hochaufgelöste SIM-Bild (SR) verwendet (Abb. 2.5 d). Dies war notwendig, da unspezifische β 3-Signale im Zellinneren und außerhalb der Zelle die Analyse verfälschen. Dafür wurde aus dem Weitfeld Signal von Paxillin eine Maske erstellt. Unspezifische extrazelluläre bzw. intrazelluläre Signale wurden in diesem Schritt sorgfältig geschwärzt (Abb. 2.5 a,b,c). Das β 3 SR-Signal wurde schließlich von der Paxillin WF-Maske subtrahiert (Abb. 2.5 e). Übrig bleiben nur β 3-Signale, die mit der Maske überlagern (Abb. 2.5 f). Unspezifischer Hintergrund wird dementsprechend entfernt. In einem weiteren Schritt wird die Kolo-kalisation des definierten β 3 SR-Signales mit dem SR-Signal des gestempelten Proteins auf den Proteinquadraten bestimmt (Abb. 2.5 g). Dies erfolgte mittels JACoP Plugin von Fiji. Berechnet wurde der *Manders Overlap Coefficient* (MOC), der Pixel für Pixel den Grad der Kolo-kalisation zwischen zwei Proteinen beschreibt [227, 228]. Als Resultat wird ein Wert zwischen 0 und 1 ausgegeben (0 bedeutet keine Kolo-kalisation, 1 bedeutet perfekte Kolo-kalisation). In den Quantifizierungen wurde der Wert prozentual angegeben.

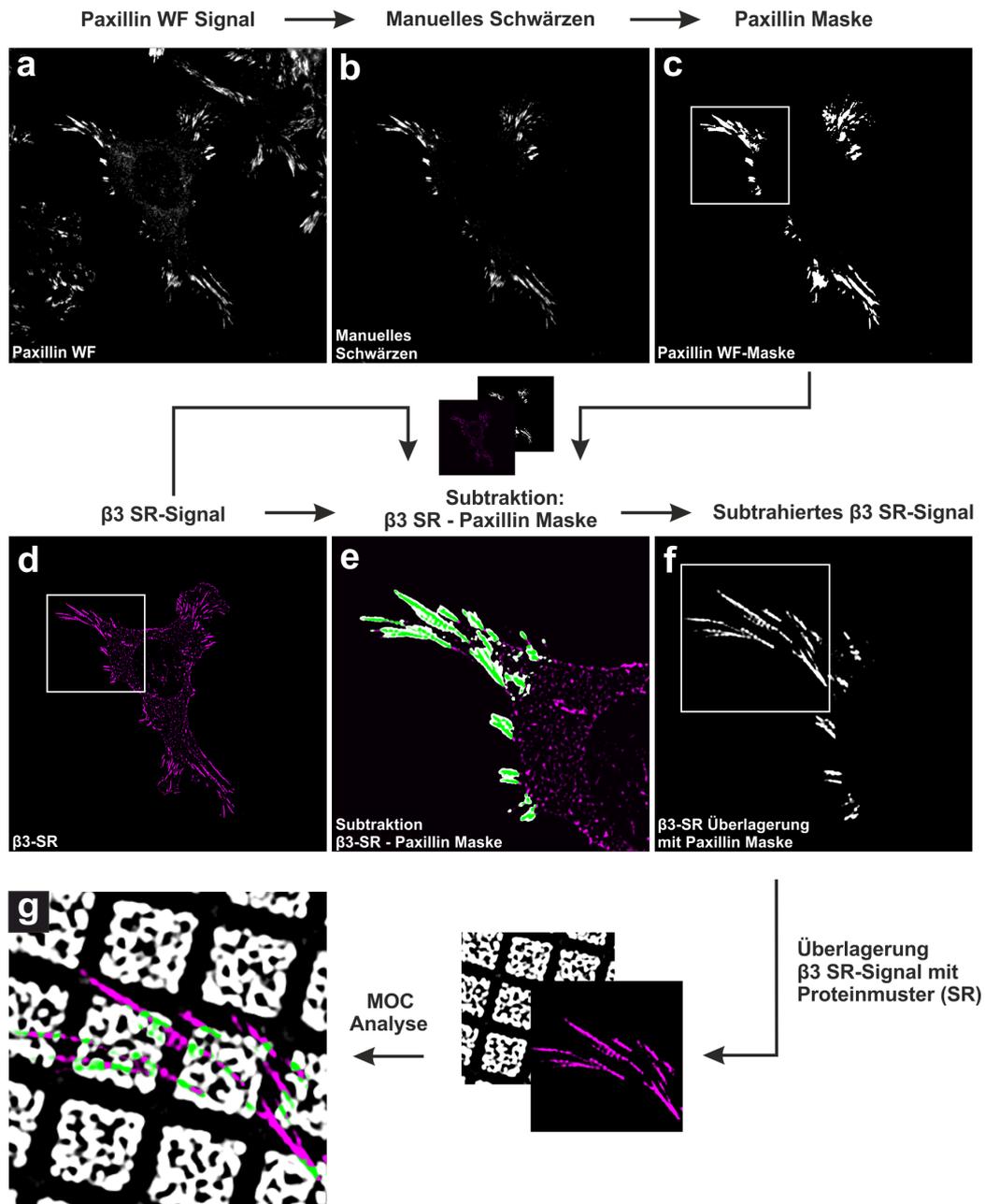


Abbildung 2.5: **Prinzip der Biolayer Interferometrie.** Für die Analyse der Lokalisation von $\beta 3$ -Integrin auf den differentiellen Proteinsubstraten wurde nur das $\beta 3$ -Signal ausgewertet, das mit Paxillin überlagert.

(a) Das Paxillin im Weitfeld Kanal dient als Indikator für funktionelle Adhäsionen. (b) Unspezifische extrazelluläre und intrazelluläre Signale werden sorgfältig ausgeschwärzt. (c) Aus den resultierenden Signalen wird eine Paxillin Maske erstellt. (d) Für die spätere Analyse der Kolokalisation zwischen $\beta 3$ -Integrin und dem gestempelten Proteinmuster wird das hochaufgelöste Bild des $\beta 3$ -Signales verwendet. (e) Das $\beta 3$ SR-Signal wird von der Paxillin Maske abgezogen. Für eine bessere Übersicht ist nur ein Ausschnitt der Zelle gezeigt. Es bleiben nur die $\beta 3$ -Signale übrig die mit der Paxillin Maske überlagern (grün). Unspezifischer Hintergrund wird entfernt (magenta). (f) Das Subtrahierte $\beta 3$ SR-Signal wird für die finale Analyse verwendet. (g) Das $\beta 3$ -Signal wird mit dem SR-Signal des gestempelten Proteins überlagert. Erneut ist für eine bessere Darstellung nur ein Ausschnitt der Zelle gezeigt. Die Analyse erfolgt mithilfe des *Manders Overlap Coefficient* (MOC). Mit dem MOC wird beschrieben welcher Anteil des $\beta 3$ -Signales mit dem Proteinmuster kolokalisiert (grün) bzw. welcher Anteil nicht kolokalisiert (magenta).

2.9 STATISTISCHE TESTS

Für alle Quantifizierungen wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet. Die entsprechenden Werte des Signifikanzniveaus (p) sind jeweils angegeben. Die Anzahl der unabhängigen Experimente (N) und die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen (n) sind ebenfalls vermerkt.

3

Kapitel 3

ERGEBNISSE

$\alpha V\beta 3$ -Integrin gehört zu den RGD-bindenden Integrinen und erkennt mindestens 12 verschiedene extrazelluläre Liganden. Es handelt sich also um einen hoch promiskuitiven Integrin-Rezeptor [16, 23]. Aktuell ist der physiologische Sinn dieser Promiskuität noch nicht wirklich verstanden. In einer *in vivo* Situation liegen in der ECM mehrere Liganden von $\alpha V\beta 3$ -Integrin gleichzeitig und in unmittelbarer Nähe zueinander vor. Wie „entscheidet“ ein derart promiskuitiver Integrin-Rezeptor aber welcher Ligand gebunden wird und welcher nicht? Erfolgt eine Ligandenbindung nach dem Prinzip „wer zuerst kommt mahlt zuerst“ oder gibt es bestimmte Liganden die präferiert gebunden werden? Im ersten Teil dieser Arbeit soll die Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin an seine publizierte Liganden Vn, Opn, Fbg, Fn und Tsp untersucht werden. Dies erfolgt mithilfe differenzieller Proteinsubstrate, die zwei Liganden gleichzeitig präsentieren. Auf solchen Substraten besteht die „Wahlfreiheit“ zwischen zwei Liganden und anhand der Lokalisation von $\alpha V\beta 3$ -Integrin kann überprüft werden ob bestimmte Liganden präferiert gebunden werden. Dies gibt indirekt Aufschluss über mögliche differenzielle Affinitäten von $\alpha V\beta 3$ -Integrin.

Ursprünglich wurde $\alpha V\beta 3$ -Integrin durch seine hohe Selektivität für den Liganden Vn als der Vn-Rezeptor beschrieben [31]. Mittlerweile gibt es zahlreiche Gruppen, die seine Funktion als Fn-Rezeptor analysiert haben [45–47]. Beide Proteine werden von $\alpha V\beta 3$ -Integrin über die RGD-Sequenz gebunden. Im zweiten Teil dieser Arbeit soll am Beispiel der beiden extrazellulären RGD-Proteine Fn und Vn untersucht werden welcher Ligand unter welchen zellulären Bedingungen gebunden wird und welche Regulationsmechanismen eine Zelle für differenzielle Ligandenbindung zur Verfügung hat. Mithilfe pharmakologischer Inhibitoren und spezieller Integrin Mutationen soll vor allem die Rolle intrazellulärer Kontraktilität und die Rolle der Integrin Konformation überprüft werden.

3.1 α V β 3-INTEGRIN ZEIGT HOHE SELEKTIVITÄT FÜR DIE LIGANDEN VITRONEKTIN UND OSTEOPONTIN

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Ligandenbindung von α V β 3-Integrin für eine Reihe publizierter Liganden (Vn, Fn, Opn, Fbg, Tsp) auf homogen beschichteten Zellkultursubstraten untersucht. Dabei wird einer Zelle nur ein Ligand präsentiert und man kann die Adhäsionsbildung spezifisch auf diesem einen Liganden untersuchen. Die Morphologie (z.B. Adhäsionsfläche) oder die Intensität von α V β 3-Integrin in den Adhäsionen geben indirekt Rückschluss ob es sich um geeignete Liganden handelt oder nicht.

Für dieses Experiment wurden Glassubstrate homogen mit dem jeweiligen Protein (Vn, Fn, Opn, Fbg oder Tsp) beschichtet und β 3-wt GFP transfizierte Zellen für zwei Stunden in Zellkulturmedium ohne Zusätze von Serum auf dem Substrat kultiviert. Anschließend wurde Paxillin, als Marker für Integrin-vermittelte Adhäsionen, und Aktin immunhistochemisch visualisiert. Die Experimente auf homogen beschichtetem Fbg und Tsp wurden in einer betreuten Masterarbeit von Lia Heiser durchgeführt. Analysiert wurden jeweils die peripheren Adhäsionen auf den unterschiedlich beschichteten Proteinsubstraten. Auf allen Substraten sind deutliche Paxillin-positive Adhäsionen in der Zellperipherie erkennbar. Dies ist ein Indiz für die Bildung funktioneller Adhäsionen auf allen Liganden. Auf Vn, Opn und Fbg zeigt sich eine sehr gute Kolo-kalisation von β 3-Integrin mit Paxillin und damit eine deutliche Rekrutierung von α V β 3-Integrin in periphere Adhäsionen. Das GFP-Signal im Zellzentrum ist zudem gering und deutet auf einen geringen Anteil an nicht-geclustertem β 3-Integrin hin (Abb. 3.1 a-c). Im Gegensatz dazu kolo-kalisiert β 3-Integrin auf den Liganden Fn und Tsp nur teilweise mit Paxillin. Auch die Intensität des β 3-Signals in den Adhäsionen scheint reduziert zu sein. Stattdessen zeigt sich ein erhöhtes Signal von nicht-geclustertem β 3-Integrin im Zytoplasma (Abb. 3.1 d-e). Für eine quantitative Auswertung wurde das Intensitätsverhältnis von geclustertem β 3-Integrin in der Zellperipherie zu nicht-geclustertem β 3-Integrin im Zytoplasma analysiert (Abb. 3.1 f). Je höher dieses Verhältnis, desto stärker ist die Rekrutierung von β 3-Integrin in periphere Adhäsionen. Auf Vn und Opn ist die Rekrutierung von α V β 3-Integrin in periphere Adhäsionen am höchsten und der Anteil an nicht-geclustertem Integrin am niedrigsten. Im Gegensatz dazu ist die Rekrutierung auf Fn und Tsp signifikant reduziert. Das Intensitätsverhältnis auf homogen beschichtetem Fbg liegt zwischen den zwei Gruppen Vn/Opn und Fn/Tsp.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Bildung α V β 3-Integrin vermittelter Adhäsionen auf unterschiedlichen Liganden variiert. Auf Vn und Opn ist eine gute Rekrutierung von α V β 3-Integrin in periphere Kontakte erkennbar. Auf den Liganden Fn und Tsp dagegen scheint dieses Integrin Probleme zu haben in periphere Adhäsionen rekrutiert zu werden.

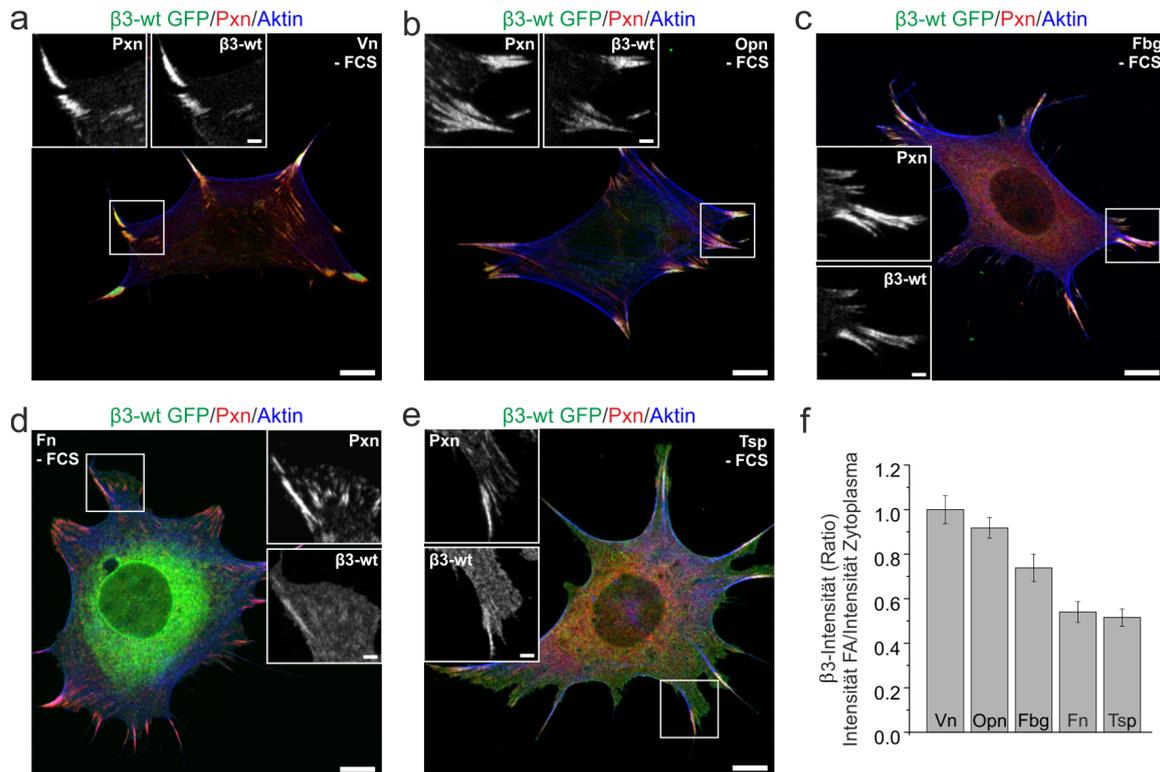


Abbildung 3.1: α V β 3-Integrin-vermittelte Adhäsionsbildung auf unterschiedlichen Liganden.

(a-e) β 3-wt GFP (grün) transfizierte 3T3low Zellen wurden auf homogen beschichteten Proteinsubstraten (Vn, Opn, Fbg, Fn, Tsp) für 2 Stunden kultiviert. Paxillin (rot) und Aktin (blau) wurden immunhistochemisch visualisiert. Alle Experimente wurden in Zellkulturmedium ohne Zusatz von FCS (-FCS) durchgeführt. Die Daten auf homogen beschichtetem Fbg und Tsp entstammen der betreuten Masterarbeit von Lia Heiser. Maßstab: 10 μ m in der Übersicht, 2 μ m in der Vergrößerung.

(f) Quantifizierung des Intensitätsverhältnisses von geclustertem β 3-Integrin in peripheren Zell-Matrix Kontakten zu nicht-geclustertem β 3-Integrin im Cytoplasma. Die einzelnen Verhältnisse wurden auf das Verhältnis für Vn -FCS normalisiert. Auf Vn und Opn ist die Intensität von β 3-Integrin in den peripheren Adhäsionen im Vergleich zum Zytoplasma am höchsten. Auf Fn und Tsp ist das Intensitätsverhältnis klar verringert. Der Ligand Fbg liegt zwischen den beiden Gruppen Vn/Opn und Fn/Ths. Vn: N=3, n=70; Opn: N=3, n=61; Fbg: N=3, n=64; Fn: N=3, n=67; Tsp: N=3, n=57.

3.1.1 VITRONEKTIN AUS DEM SERUM ÜBERLAGERT SPEZIFISCH BESCHICHTETE PROTEINSUBSTRATE

Diese ligandenspezifische Rekrutierung von α V β 3-Integrin wird allerdings nur sichtbar, wenn die Experimente in Zellkulturmedium ohne FCS (-FCS) durchgeführt werden. Führt man identische Experimente in Medium mit 10% FCS (+FCS) durch, ist kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den einzelnen Liganden erkennbar (Abb. 3.2 a). Auf allen Liganden zeigt sich eine ähnlich gute Rekrutierung von α V β 3-Integrin in periphere Adhäsionen. Grund hierfür könnte eine Überlagerung der spezifisch beschichteten Proteinoberfläche mit

Serumproteinen sein. Vn kommt in sehr hohen Konzentrationen im bovinen Serum vor (200-400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) [229]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Vn aus dem Serum an die homogen beschichtete Proteinoberfläche adsorbiert. Um dies zu überprüfen wurden homogen beschichtete Fn-Substrate 2 Stunden in Medium -FCS bzw. in Medium +FCS kultiviert und anschließend eine immunhistochemische Färbung gegen bovines Vn durchgeführt. In Medium -FCS ist nur ein Signal des Alexa647-markierten Fn auf der Oberfläche erkennbar. Werden Substrate allerdings in Medium +FCS kultiviert, ist ein deutliches Vn-Signal auf der Oberfläche vorhanden, das mit dem Fn-Signal kolokalisiert (Abb. 3.2 b). Eine solche Überlagerung der Proteinoberfläche mit bovinem Vn aus dem Serum wurde auch für homogen beschichtete Opn-, Fbg- und Tsp-Oberflächen beobachtet. Serumproteine aus dem Medium können also eine homogen beschichtete Proteinoberfläche überlagern. Möchte man spezifisch das Integrin-Verhalten in Antwort auf einen einzelnen Liganden untersuchen muss man auf den Einsatz von FCS im Experiment verzichten.

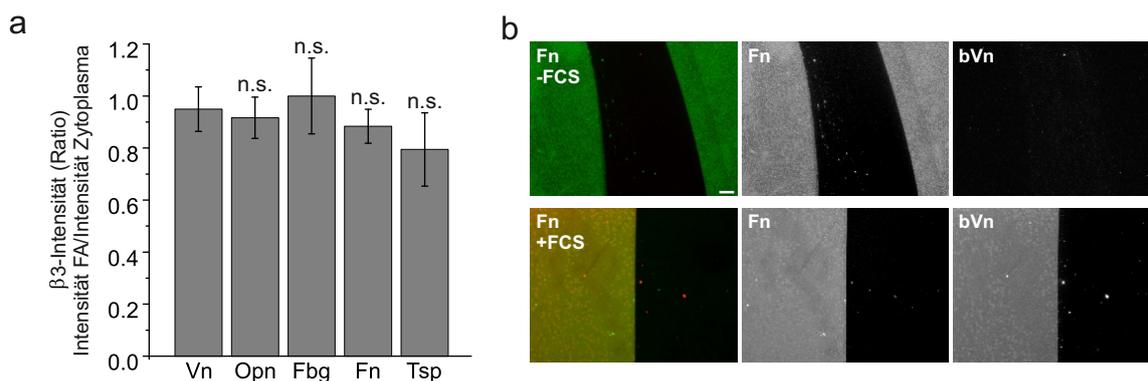


Abbildung 3.2: **Serumproteine überlagern eine spezifisch beschichtete Proteinoberfläche.**

(a) $\beta 3$ -wt GFP transfizierte 3T3low Zellen wurden auf homogen beschichteten Proteinsubstraten (Vn, Opn, Fbg, Fn, Tsp) in Medium mit FCS (+FCS) für 2 Stunden kultiviert. Quantifiziert wurde das Intensitätsverhältnis von geclustertem $\beta 3$ -Integrin in peripheren Zell-Matrix Kontakten zu nicht-geclustertem $\beta 3$ -Integrin im Zytoplasma. Die einzelnen Verhältnisse wurden auf das Verhältnis für Fbg +FCS normalisiert. Durch den Einsatz von FCS ist kein Unterschied mehr zwischen den verschiedenen Liganden zu beobachten. Die Rekrutierung von $\beta 3$ -Integrin in periphere Adhäsionen ist auf allen Liganden etwa gleich. Die Daten auf homogen beschichtetem Fbg und Tsp entstammen der betreuten Masterarbeit von Lia Heiser. Vn: N=3, n=67; Opn: N=3, n=64; Fbg: N=3, n=69; Fn: N=3, n=69; Tsp: N=3, n=63.

(b) Homogen beschichtete Fn-Substrate (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aktives Fn + Fraktion Alexa647-markiertes Fn (1:40)(grün)) wurden in Medium ohne FCS (-FCS) und in Medium mit 10% FCS (+FCS) für 2 Stunden kultiviert. Bovines Vn (rot) wurde immunhistochemisch angefärbt. Nur in der Kondition +FCS kolokalisiert Vn aus dem Serum deutlich mit Fn auf der Substratoberfläche. Serumproteine können also eine homogen beschichtete Proteinoberfläche überlagern. Maßstab: 10 μm

3.2 α V β 3-INTEGRIN BINDET AUF DIFFERENZIELLEN PROTEINSUBSTRATEN BEVORZUGT AN VITRONEKTIN BZW. OSTEOPONTIN

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass nicht alle publizierten Liganden von α V β 3-Integrin mit gleicher Affinität gebunden werden. Vor allem Vn und Opn scheinen geeignete Liganden von α V β 3-Integrin zu sein. Homogen beschichtete Proteinsubstrate können allerdings nicht die Komplexität der ECM imitieren. In einer *in vivo* Situation werden einer Zelle verschiedene Liganden gleichzeitig und in unmittelbarer Nähe zueinander präsentiert [1, 205]. Daher hat unsere Arbeitsgruppe differenzielle Proteinsubstrate entwickelt, um der physiologischen Situation mit einer komplexen ECM einen Schritt näher zu kommen. Auf diesen Substraten liegen zwei verschiedene Proteine sauber getrennt und im subzellulären Maßstab vor [216, 230]. Die Geometrie des Proteinmusters wurde so gewählt, dass die Fläche beider Proteine etwa gleich ist. Dabei wird ein Protein gestempelt (2x2 μ m Proteinquadrate) und die Bereiche zwischen dem Stempelmuster werden mit dem zweiten Protein funktionalisiert (s. Kapitel 2.2.5). Mit diesem System hat eine Zelle die Wahl auf welchem Liganden sie präferiert α V β 3-vermittelte Adhäsionen bildet. Da die Rekrutierung von α V β 3-Integrin in periphere Adhäsionen auf homogenem Vn am höchsten war, wurde Vn jeweils mit einem weiteren Liganden kombiniert. Es wurden folgende Proteinkombinationen erstellt: Vn/Opn Substrate (Abb. 3.3 a), Vn/Fbg Substrate (Abb. 3.3 b), Vn/Tsp Substrate (Abb. 3.3 c) und Fn/Vn Substrate (Abb. 3.3 d). Das zuerst genannte Protein wurde immer gestempelt und mit dem zweiten Protein wurden die Bereiche zwischen dem Stempelmuster funktionalisiert. Mit dieser Methode konnte bei allen getesteten Proteinkombination eine saubere Trennung beider ECM-Proteine auf einem Substrat erreicht werden (Abb. 3.3 i). Die Daten der Vn/Fbg Substrate und Vn/Tsp Substrate entstammen der betreuten Masterarbeit von Lia Heiser. 3T3low Zellen wurden mit β 3-wt GFP transfiziert und für zwei Stunden auf den differenziellen Substraten kultiviert. Zudem wurde Paxillin immunhistochemisch visualisiert und Zellen wurden mit hochauflösender Mikroskopie (*structured illumination microscopy* (SIM)) aufgenommen. Dadurch kann die Lokalisation der Integrin-vermittelten Kontakte präzise bestimmt werden. Auf Vn/Opn Substraten scheint α V β 3-Integrin kein Unterschied zwischen den Liganden zu erkennen und es zeigt sich eine nahezu identische Lokalisation auf beiden Liganden (54.4% Kolokalisation mit Vn; Abb. 3.3 e). Auf Vn/Fbg Substraten lokalisiert α V β 3-Integrin präferiert auf Vn und zeigt nur 20.2% Kolokalisation mit Fbg (Abb. 3.3 f). Auch auf Fn/Vn Substraten ist Vn der klar bevorzugte Ligand und die Kolokalisation mit Fn beträgt nur 16.5% (Abb. 3.3 g). Auf Vn/Tsp Substraten wird die Bildung α V β 3-vermittelter Adhäsionen auf Tsp klar vermieden (6.7% Kolokalisation mit Tsp; Abb. 3.3 h). Zusammenfassend bindet α V β 3-Integrin bevorzugt an Vn und Opn, während Fn und Fbg eher vermieden werden. Im Gegensatz dazu scheint Tsp kein geeigneter Ligand zu sein.

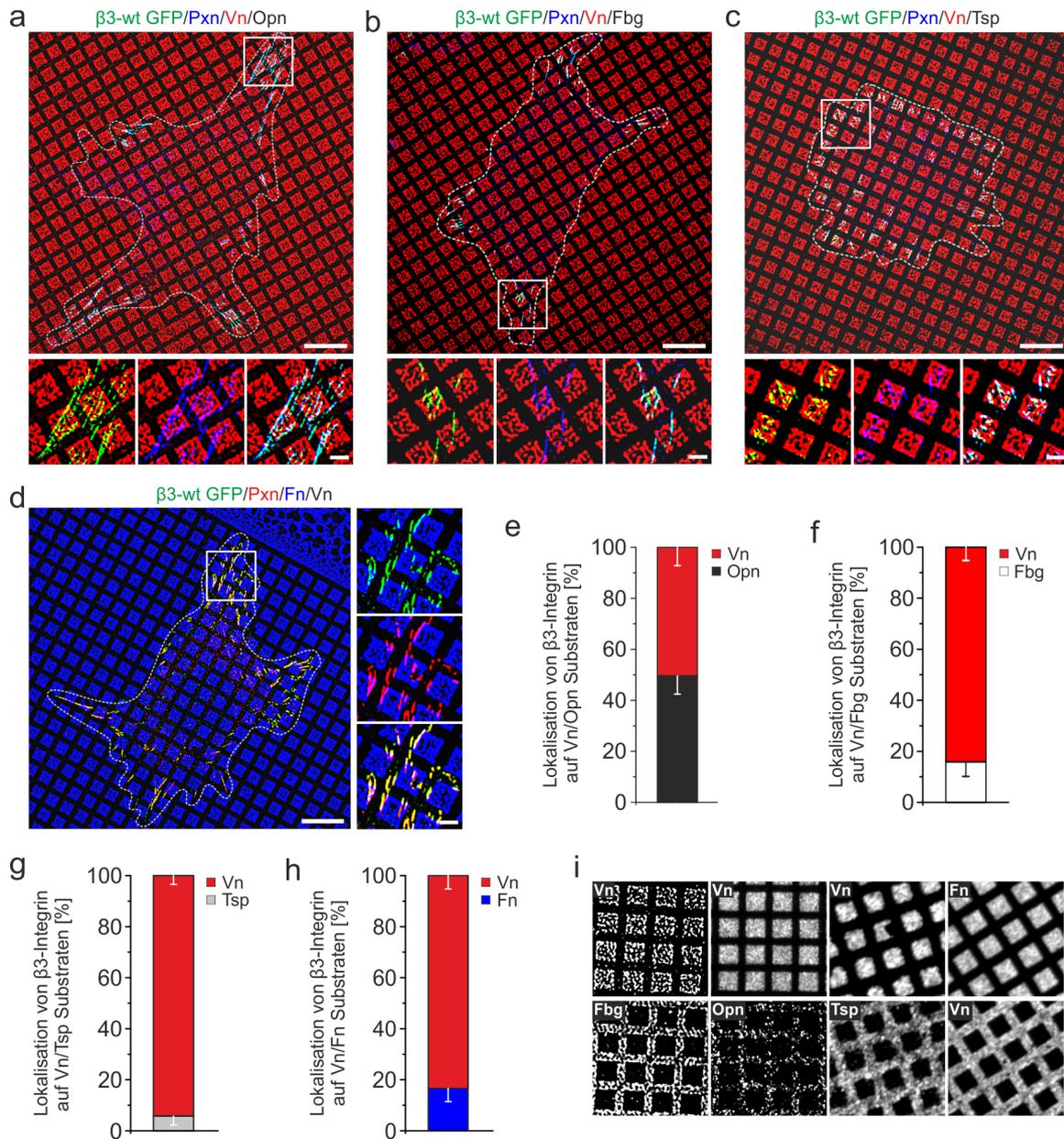


Abbildung 3.3: **Lokalisation von $\alpha V \beta 3$ -Integrin auf differenziellen Proteinsubstraten.**

(a) Vn-Quadrate (rot) wurden auf ein Glas-Substrat gestempelt und die freien Bereiche zwischen den Vn-Quadraten wurden mit Opn (schwarz) funktionalisiert. 3T3low Zellen wurden mit $\beta 3$ -wt GFP (grün) transfiziert und für zwei Stunden auf den Vn/Opn Substraten kultiviert. Paxillin (blau) wurde immunhistochemisch angefärbt. Maßstab (a-d): Übersicht 10 μm , Vergrößerung 2 μm .

(b) Identisches experimentelle Setup wie in (a) allerdings wurden Zellen auf einem Vn/Fbg Substrat kultiviert.

(c) Zellen wurden wie in (a) auf einem Vn/Tsp Substrat kultiviert.

(d) 3T3low Zellen wurden mit $\beta 3$ -wt GFP (grün) transfiziert und für zwei Stunden auf Fn/Vn Substraten kultiviert. Paxillin (rot) wurde immunhistochemisch angefärbt. Auf diesen Substraten wurde Fn (blau) gestempelt und die Bereiche zwischen dem Fn-Muster wurden mit Vn (schwarz) geflutet.

(e-h) Quantifizierung der Kollokalisierung von $\beta 3$ -Integrin mit den ECM Proteinen auf den einzelnen Substraten. $\beta 3$ -Integrin lokalisiert bevorzugt auf Vn bzw. Opn. Auf Vn/Opn Substraten zeigt sich nahezu eine 50/50 Verteilung. Auf Vn/Fbg bzw. Vn/Fn Substraten ist Vn der klar bevorzugte Ligand. Die Kollokalisierung mit Fbg beträgt 20.2%, die Kollokalisierung mit Fn 16.5%. Tsp ist kein geeigneter Ligand von $\alpha V\beta 3$ -Integrin. Die Kollokalisierung mit Tsp beträgt lediglich 6.7%. Vn/Opn. Die Experimente auf Vn/Fbg- und Vn/Tsp Substraten wurden in einer betreuten Masterarbeit von Lia Heiser durchgeführt. Vn/Opn: N=3, n=45; Vn/Fbg: N=3, n=57; Vn/Tsp: N=3, n=34; Fn/Vn: N=4, n=66.

(i) Visualisierung der jeweiligen ECM Proteine auf den differentiellen Proteinsubstraten. Für alle getesteten Proteinkombinationen zeigt sich eine saubere Trennung beider Proteine auf einem Substrat.

3.3 $\alpha V\beta 3$ -INTEGRIN BINDET VITRONEKTIN MIT HÖHERER AFFINITÄT ALS FIBRONEKTIN

Die unterschiedliche Lokalisation von $\alpha V\beta 3$ -Integrin auf den differentiellen Proteinsubstraten könnte bedeuten, dass dieses Integrin seine Liganden mit unterschiedlicher Affinität bindet. Um dies zu überprüfen wurden mittels Bio-Layer-Interferometrie (BLI) biochemische Affinitätsmessungen durchgeführt. Für die Affinitätsmessungen und für alle nachfolgenden Experimente wurden Vn und Fn als Liganden ausgewählt. Beide Proteine sind anerkannte Liganden von $\alpha V\beta 3$ -Integrin [31, 44–47]. Zudem zeigen die Lokalisationsstudien, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin bevorzugt an Vn bindet, während eine Bildung von Adhäsionen auf Fn eher vermieden wird. Damit ergibt sich mit diesen beiden Liganden ein interessantes System, um mögliche Mechanismen einer differentiellen Ligandenbindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin zu untersuchen.

Für die BLI-Messungen wurde zunächst aufgereinigtes $\alpha V\beta 3$ -Integrin über einen His-Tag an einen Ni-NTA Biosensor gebunden (Abb. 3.4 a: Ladephase). Ein Baseline Schritt vor und nach der Ladephase dient der Etablierung einer stabilen Messkurve mit minimaler Drift des Systems. Für die Assoziationsphase wurde der Integrin-beladene Biosensor in eine Lösung mit löslichem Fn bzw. Vn überführt (Abb. 3.4 a: Assoziation). Eine mögliche Integrin-Ligand Interaktion kann mithilfe des BLItz-Systems in Echtzeit aufgezeichnet werden (s. Kapitel 2.6). Gemessen wird hierbei die Schichtdicke der assoziierten Proteine am Biosensors. Eine Erhöhung der Schichtdicke während der Assoziationsphase ist dabei ein direktes Maß für die Bindung von Liganden an den Integrin-beladenen Biosensor. Für die Dissoziationsphase wird der Biosensor in eine Lösung ohne Ligand überführt. Dissoziiert der Ligand in dieser Phase von $\alpha V\beta 3$ -Integrin, verringert sich die Schichtdicke am Biosensor (Abb. 3.4 a: Dissoziation). Aus der Kinetik der Assoziationskurve und der Dissoziationskurve lässt sich schließlich die Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_D) berechnen. Die repräsentativen Assoziationskurven zeigen, dass sowohl Vn als auch Fn an das aufgereinigte $\alpha V\beta 3$ -Integrin

auf dem Biosensor binden (Abb. 3.4 b). Durch Bindung von Vn wird dabei eine höhere Schichtdicke erreicht als durch Bindung von Fn. Die Kontrolle mit Integrin-beladenem Biosensor aber ohne Ligand zeigt weder Assoziation noch Dissoziation (Abb. 3.4 b). Es gibt also keine unspezifische Bindung von Komponenten des Integrin-Puffers an den Biosensor.

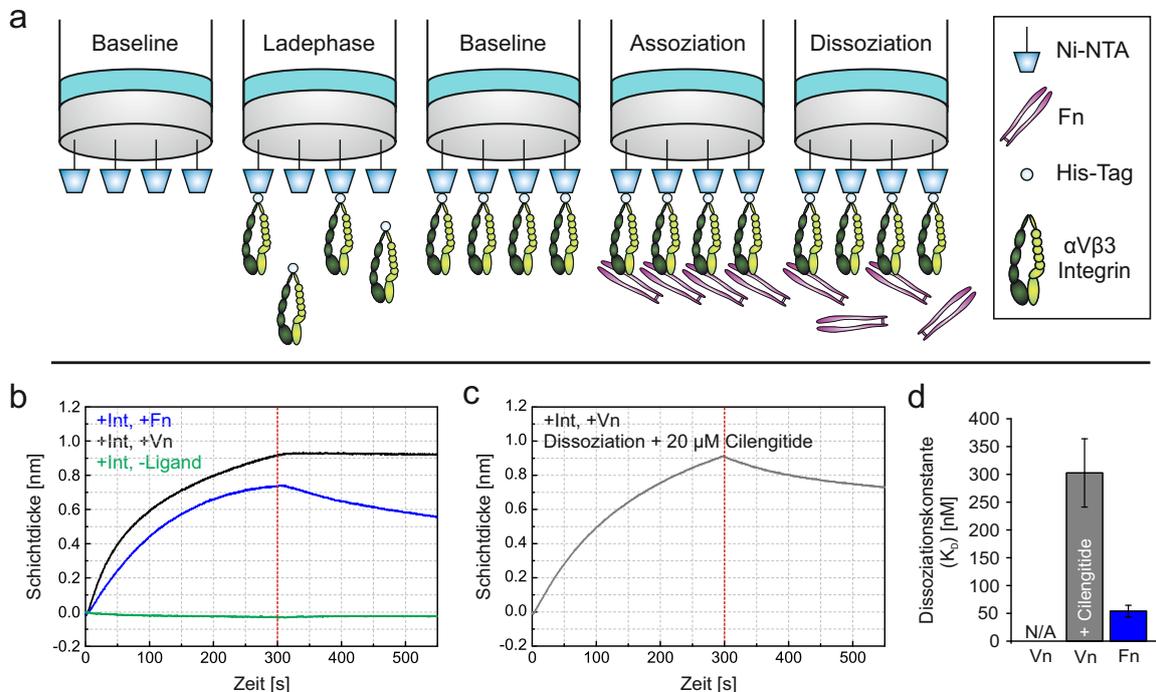


Abbildung 3.4: **Biochemische Bindungsaffinität von $\alpha V\beta 3$ -Integrin für Fn bzw. Vn.**

(a) Prinzip der Bio-Layer-Interferometrie (BLI). Für die Messungen wurde zunächst ein Baseline Schritt (45s) in Integrin-Puffer durchgeführt, um eine stabile Messkurve zu erhalten. Anschließend wurde aufgereinigtes $\alpha V\beta 3$ -Integrin in einer Ladephase (180s) an den Biosensor gebunden. Nach der Ladephase erfolgte ein erneuter Baseline Schritt (45s). In der Assoziationsphase (300s) wurde entweder Vn oder Fn als Ligand zugegeben. Die Dissoziationsphase (250s) erfolgte in Integrin Puffer ohne Ligand. Im Cartoon ist die Assoziation und Dissoziation beispielhaft für Fn gezeigt.

(b) Biochemische Affinitätsmessungen von aufgereinigtem $\alpha V\beta 3$ -Integrin für seine Liganden Fn (blaue Kurve) und Vn (schwarze Kurve). Dargestellt sind repräsentative Kurven der Assoziationsphase (0-300s) und Dissoziationsphase (300-550s). Die Kurve für das Beladen des Biosensors mit $\alpha V\beta 3$ -Integrin vor der Assoziation und Dissoziation sind nicht dargestellt. Sowohl Fn als auch Vn binden an $\alpha V\beta 3$ -Integrin auf dem Biosensor. Fn zeigt im Gegensatz zu Vn eine eindeutige Dissoziation. Die Kontrolle mit einem Integrin-beladenen Biosensor ohne Ligand zeigt keine unspezifische Bindung von Pufferkomponenten an den Biosensor.

(c) Repräsentative BLI Kurve für Vn Assoziation (0-300s) und Dissoziation (300-550s). Im Dissoziationspuffer wurde Cilengitide in einer Konzentration von 20 μM eingesetzt. Cilengitide als Kompetitor mit hoher Affinität für $\alpha V\beta 3$ -Integrin bewirkt eine Dissoziation von Vn.

(d) K_D Werte für die Interaktion von aufgereinigtem $\alpha V\beta 3$ -Integrin mit Vn, Vn + Cilengitide und Fn. Berechnung der K_D erfolgte automatisiert mit der BLItz Software. Für die Vn Bindung konnte keine K_D ermittelt werden, da Vn im gemessenen Zeitraum keine Dissoziation von $\alpha V\beta 3$ -Integrin zeigte. Cilengitide bewirkt Dissoziation des Liganden Vn vom Integrin-beladenen Biosensor ($K_D = 302.6$ nM). Die Affinität für Fn ist mit einer K_D von 53.98 nM im messbaren Bereich. Die biochemische Affinität von $\alpha V\beta 3$ -Integrin für Vn ist also höher als für Fn. Fn: N=3, n=9; Vn: N=3, n=9; Vn + Cilengitide: N=3, n=9

Unspezifische Interaktionen der Liganden mit dem Biosensor wurden ebenfalls experimentell ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). In der Dissoziationsphase wird ein großer Unterschied zwischen beiden Liganden deutlich. Fn zeigt eine deutliche Dissoziation von $\alpha V\beta 3$ -Integrin mit einer K_D von 53.98 nM (Abb. 3.4 b,d). Für Vn dagegen ist keine Dissoziation erkennbar, weshalb auch keine Dissoziationskonstante ermittelt werden konnte. Erst nach Zugabe von Cilengitide als Kompetitor mit sehr hoher Affinität für die Ligandenbindungstasche von $\alpha V\beta 3$ -Integrin ist eine Dissoziation von Vn ($K_D = 302.6$ nM) messbar (Abb. 3.4 c,d). Die nicht vorhandene Dissoziation von Vn ist also kein Artefakt und kann durch einen Kompetitor mit hoher Affinität für $\alpha V\beta 3$ -Integrin induziert werden. Die biochemischen Affinitätsmessungen mit BLI zeigen also, dass Vn ein Ligand mit sehr hoher Affinität für $\alpha V\beta 3$ -Integrin ist und Fn ein Ligand mit vergleichsweise niedriger Affinität.

3.4 $\alpha V\beta 3$ -INTEGRIN KANN NUR IM MATURIERTEN ZUSTAND AN FIBRONEKTIN BINDEN

Mit diesen Ergebnissen könnte man trivial argumentieren, dass die unterschiedliche Lokalisation auf Fn/Vn Substraten durch unterschiedliche Affinitäten von $\alpha V\beta 3$ -Integrin für Fn bzw. Vn zustande kommt. Beobachtet man aber die Adhäsionsbildung lebender Zellen auf Fn/Vn Substraten zeigt sich ein unerwarteter Effekt. Dafür wurden $\beta 3$ -Integrin GFP transfizierte 3T3low Zellen auf den Substraten ausgesät und mittels SIM-Lebendzellmikroskopie wurde die Ausbreitungsphase einzelner Zellen aufgenommen. In dieser Phase bilden sich in der Zellperipherie zahlreiche neue, punktförmige Adhäsionen, die mit fortlaufender Zeit größer werden und dem Reifungsprozess unterliegen (Abb. 3.5 a). Fokussiert man sich auf die Zellperipherie und bestimmt den Entstehungsort einzelner initialer Adhäsionen zeigt sich, dass alle $\beta 3$ -wt vermittelten Adhäsionen ausschließlich auf Vn entstehen (Abb. 3.5 b,c). In keinem der Experimente wurde eine Entstehung einer initialen Adhäsion auf Fn beobachtet (Masterarbeit Kai Weißenbruch [218]). Adhäsionen, die an der Fn/Vn Grenzfläche entstehen wurden in eine eigene Kategorie eingeteilt. In solchen Fällen ist die Auflösung der limitierende Faktor, um eine eindeutige Aussage über den Entstehungsort zu treffen (Abb. 3.5 c). Während des Reifungsprozesses werden initiale Adhäsionen größer und einige Adhäsionen zeigen schließlich eine Translokation von Vn auf Fn. Interessanterweise findet diese Translokation immer in Richtung Zellzentrum statt (Abb. 3.5 b, gelbe Pfeile). Es scheint somit als könnten initiale Adhäsionen nur auf dem Ligand Vn entstehen während eine Fn-Bindung erst im maturierten Zustand möglich ist. Damit zeigt sich eine dynamische Veränderung während der Adhäsionsreifung, die sich nicht durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten von $\alpha V\beta 3$ -Integrin für Fn vs. Vn erklären lässt.

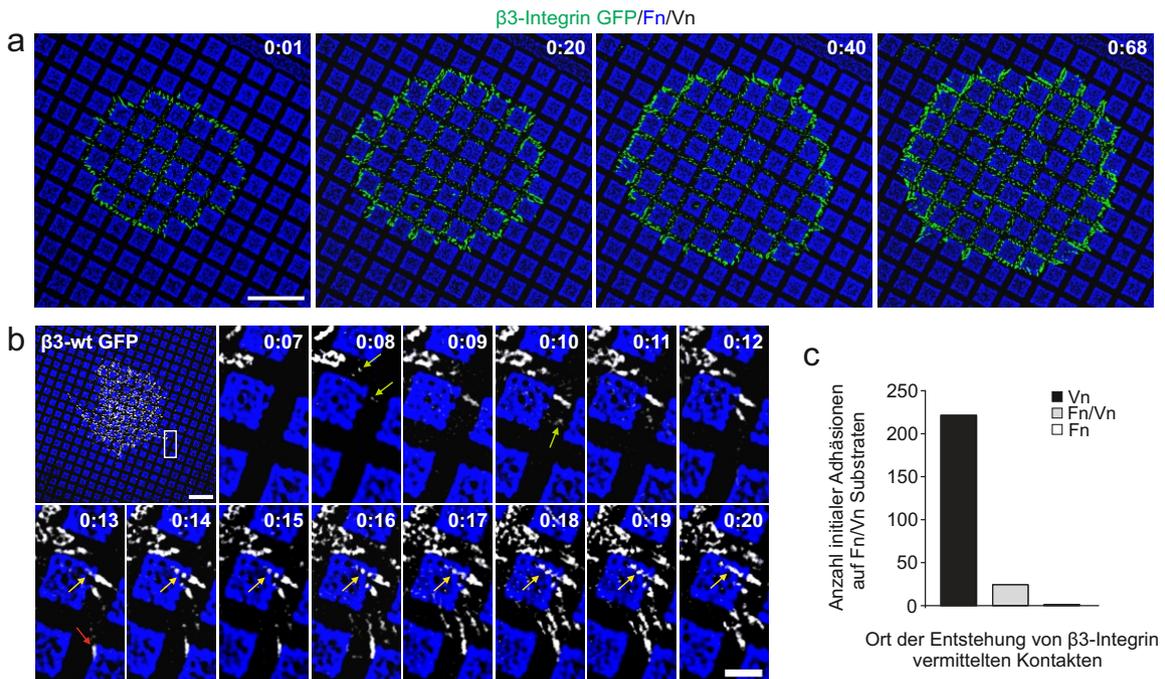


Abbildung 3.5: **Bildung initialer Adhäsionen und Adhäsionsdynamik von α V β 3-Integrin auf Fn/Vn Substraten.**

(a) Repräsentative Aufnahme einer β 3-Integrin GFP (grün) transfizierten Zelle auf Fn/Vn Substraten (Fn in blau), die sich gerade abflacht und ausbreitet. Während der Ausbreitungsphase entstehen zahlreiche initiale Adhäsionen in der Zellperipherie und die Zellfläche vergrößert sich. (b) β 3-wt GFP (weiß) transfizierte 3T3low Zellen wurden auf Fn/Vn Substraten (Fn in blau) mit SIM Lebendzellmikroskopie aufgenommen. Die Vergrößerungen zeigen sowohl initiale Adhäsionsbildung als auch Adhäsionsmaturierung. Grüne Pfeile zeigen initiale Adhäsionen, die auf Vn entstehen. Der rote Pfeil zeigt eine initiale Adhäsion, die an der Fn/Vn Grenzfläche entsteht. Gelbe Pfeile verfolgen eine Adhäsion, die auf Vn entstanden ist und während der Maturierung schließlich Fn-Bindung eingeht. Dieses Experiment wurde von Kai Weißenbruch durchgeführt und die Daten wurden dieser Arbeit zur Verfügung gestellt [218]. Maßstab: Übersicht 10 μ m, Vergrößerung 2 μ m.

(c) Entstehungsort initialer β 3-wt-vermittelter Adhäsionen auf Fn/Vn Substraten. Der Großteil aller initialen Adhäsionen entsteht auf Vn. N=3, n=246 (246 initiale Adhäsionen, 6 Zellen)

3.5 VERRINGERTER MECHANISCHER ZUG AUF α V β 3-INTEGRIN FÜHRT ZU REDUZIERTER FN-BINDUNG

Da die Initiation einer α V β 3-vermittelten Adhäsion ausschließlich auf Vn erfolgt, stellt sich die Frage warum Fn-Bindung erst im maturierten Zustand stattfinden kann. Besonders auffällig war dabei, dass die Translokation einer maturierten Adhäsion von Vn auf Fn immer entlang des retrograden Aktinflusses in Richtung Zellzentrum erfolgte (Abb. 3.4 d). Damit lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Aktin/Myosin Kontraktilität möglicherweise eine wichtige Rolle für eine Fn-Bindung von α V β 3-Integrin spielt.

Um den Einfluss mechanische Kräfte auf die Ligandenbindung von α V β 3-Integrin zu über-

prüfen, wurde die Aktin/Myosin-vermittelte Kontraktilität mit Blebbistatin reduziert. Blebbistatin wirkt auf Myosine direkt, indem es die ATPase Aktivität inhibiert [231]. Dieses Experiment wurde bereits in der Masterarbeit durchgeführt [217]. $\beta 3$ -wt GFP transfizierte 3T3low Zellen wurden für 2h auf Fn/Vn Substraten kultiviert und über die gesamte Dauer der Kultivierung mit 10 μ M Blebbistatin behandelt. Die Zellen zeigen den typischen Blebbistatin-Phänotyp mit großen lamellipodialen Ausläufern und vielen kleinen, punktförmigen Adhäsionen in der Zellperipherie. Interessanterweise sind diese punktförmigen, $\beta 3$ -Integrin Adhäsionen fast ausschließlich auf Vn lokalisiert während die Fn-Bereiche klar vermieden werden (Abb. 3.6 a). Die Kolokalisation mit Fn liegt nur bei 7.4 % und ist damit im Vergleich zur DMSO Kontrolle signifikant reduziert (Abb. 3.6 b).

In einem zweiten Ansatz wurde die Reduzierung der Aktin/Myosin Kontraktilität durch genetischen *Knockout* des Proteins Vinculin erreicht. Vinculin ist ein intrazelluläres Adapterprotein fokaler Adhäsionen und hat bedeutende Rolle in der Übertragung von Kräften zwischen Aktin und Integrinen [230, 232]. Zahlreiche Publikationen zeigen zudem, dass ein *Knockout* von Vinculin die Kraftgenerierung einer Zelle auf das unterliegende Substrat reduziert [233–236]. Um zu überprüfen ob Vinculin-abhängige Kraftgenerierung einen Einfluss auf die Ligandenbindung von $\alpha V \beta 3$ -Integrin hat, wurden Vinculin-defiziente Mausfibroblasten (MEF Vcl -/-) verwendet. Diese Zelllinie wurde von W.H. Ziegler zur Verfügung gestellt [234]. Im Gegensatz zu den bisher verwendeten 3T3low Zellen haben MEF Vcl -/- allerdings kein reduziertes Level an endogenem $\beta 3$ -Integrin. Zusätzliche Expression von $\beta 3$ -wt GFP führt folglich zu einer Überexpression. Als Kontrolle wurden daher MEF-wt Zellen für $\beta 3$ -wt GFP transfiziert und auf Fn/Vn Substraten kultiviert. Die Experimente zeigen, dass sich $\beta 3$ -Integrin in MEF-wt Zellen (17.3% Kolokalisation mit Fn) und in 3T3low Zellen (16.5% Kolokalisation mit Fn) identisch verhalten (Abb. 3.6 c,d). Eine Überexpression von $\beta 3$ -wt scheint also die differenzielle Ligandenbindung nicht zu beeinflussen. Der Effekt scheint zudem nicht zelltypspezifisch zu sein. Wird $\beta 3$ -wt GFP in MEF Vcl -/- Zellen exprimiert, lokalisiert dieses Integrin fast ausschließlich auf Vn während die Kolokalisation mit Fn lediglich bei 7.3 % liegt (Abb. 3.6 c,e). Ein Vinculin *Knockout* hat also den gleichen Effekt auf die $\beta 3$ -Integrin vermittelte Ligandenbindung wie eine Blebbistatin Behandlung. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein Restitutionsexperiment durchgeführt. Es sollte überprüft werden ob eine Vinculin Expression in MEF Vcl -/- Zellen die Fn-Bindung wieder auf Kontroll-Level erhöhen kann. Dafür wurden MEF Vcl -/- Zellen für $\beta 3$ -wt GFP und Vinculin mCherry transfiziert und auf Fn/Vn Substraten kultiviert. Die Re-Expression von Vinculin bewirkt, dass $\beta 3$ -Integrin vermittelte Adhäsionen nicht mehr ausschließlich auf Vn-Bereiche beschränkt sind, sondern teilweise auch auf Fn lokalisieren (Abb. 3.6 f). Eine Quantifizierung ergibt 17.2% Kolokalisation mit Fn und zeigt damit einen ähnlichen Wert wie die Kontrolle (Abb. 3.6 c).

Die Blebbistatin und Vinculin *Knockout* Experimente lassen also vermuten, dass die Fn vs. Vn Bindung von α V β 3-Integrin durch Aktin/Myosin Kontraktilität reguliert werden kann. Eine Reduzierung mechanischer Kräfte führt zu erhöhter Selektivität von α V β 3-Integrin für den Liganden Vn.

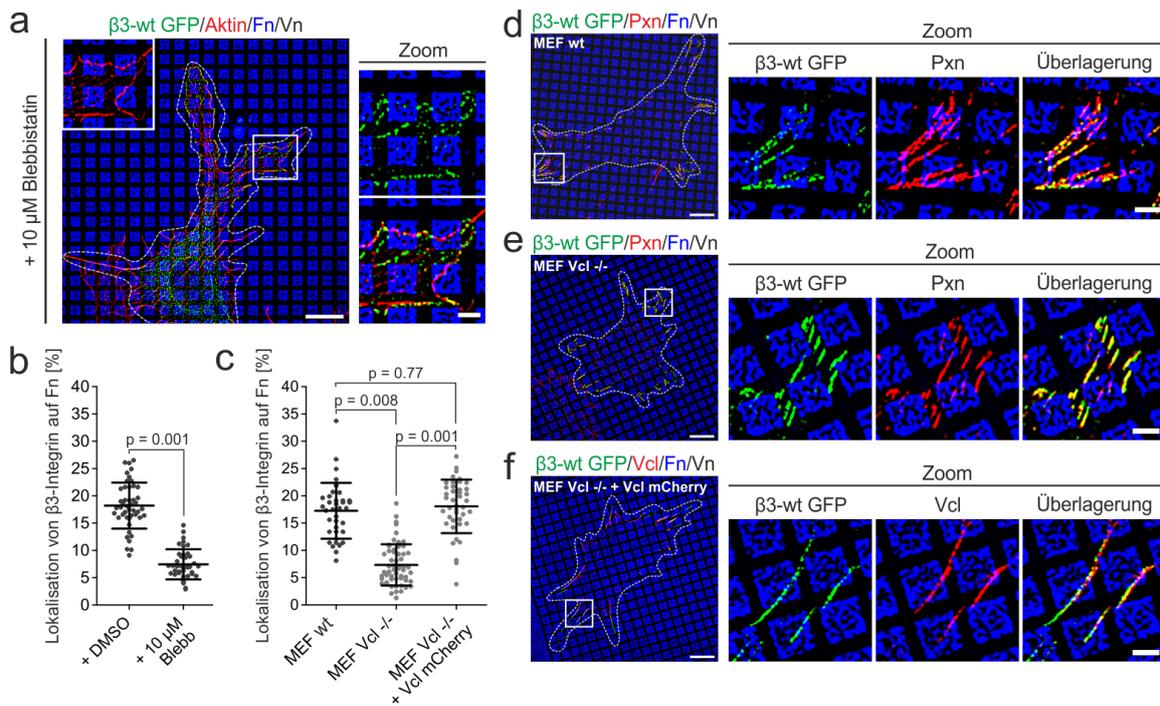


Abbildung 3.6: **Mechanische Kräfte regulieren die differenzielle Ligandenbindung von α V β 3-Integrin.**

(a) 3T3low Zellen wurden mit β 3-wt GFP (grün) transfiziert und für zwei Stunden auf Fn/Vn Substraten (Fn in blau) kultiviert. Myosin Aktivität wurde mit Blebbistatin (10 μ M) inhibiert. Aktin (rot) wurde immunhistochemisch angefärbt. Die weiße, gestrichelte Linie kennzeichnet den Zellumriss. Maßstab: Übersicht 10 μ m, Vergrößerung 2 μ m.

(b) Quantifizierung der Kolokalisation von β 3-wt GFP mit Fn. Gezeigt ist die DMSO Kontrolle und die Kondition, die mit 10 μ M Blebbistatin behandelt wurde (a). Blebbistatin Behandlung führt zu signifikant reduzierter Fn-Bindung von α V β 3-Integrin im Vergleich zur Kontrolle. β 3-wt + DMSO: N=3, n=38; β 3-wt + Blebb: N=3, n=40.

(c) Quantifizierung der Kolokalisation von β 3-wt GFP mit Fn für die jeweiligen Konditionen d-f. Vinculin *Knockout* führt wie Blebbistatin Behandlung zu signifikant reduzierter Fn-Bindung von α V β 3-Integrin. Eine Re-Expression von Vinculin erhöht die Kolokalisation mit Fn auf wt-Level. MEF-wt: N=3, n=38; MEF Vcl -/-: N=3, n=57; MEF Vcl -/- + Vcl mCherry: N=3, n=42.

(d) MEF-wt Zellen wurden mit β 3-wt GFP (grün) transfiziert und für zwei Stunden auf Fn/Vn Substraten (Fn in blau) kultiviert. Paxillin (rot) wurde immunhistochemisch angefärbt.

(e) MEF Vcl -/- Zellen wurden mit β 3-wt GFP (grün) transfiziert und für zwei Stunden auf Fn/Vn Substraten (Fn in blau) kultiviert. Paxillin (rot) wurde immunhistochemisch angefärbt.

(f) MEF Vcl -/- Zellen wurden mit β 3-wt GFP (grün) und Vinculin mCherry (rot) transfiziert und für zwei Stunden auf Fn/Vn Substraten (Fn in blau) kultiviert. Maßstab (d-f): Übersicht 10 μ m, Vergrößerung 2 μ m. Die weiße, gestrichelte Linie kennzeichnet jeweils den Zellumriss.

3.5.1 DE NOVO INDUZIERTE INTEGRIN CLUSTER SIND NICHT MECHANISCH AN AKTIN GEKOPPELT UND BINDEN AUSSCHLIESSLICH VITRONEKTIN

Der Effekt, dass eine Reduzierung der intrazellulären Kontraktilität zu einer reduzierten Fn-Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin führt, scheint sehr stabil zu sein. Dies zeigt sich in Experimenten mit sogenannten deNovo induzierten Integrin Clustern. Diese Cluster wurden bereits in der Literatur beschrieben [237]. Werden Zellen beispielsweise mit dem Integrin Aktivator Mn^{2+} behandelt entstehen zusätzlich zu peripheren Adhäsionen punktförmige Integrin Cluster im Zentrum der Zelle. Solche Cluster wurden auch beobachtet wenn $\beta 3$ -wt GFP transfizierte 3T3low Zellen auf Fn/Vn Substraten in Anwesenheit von Mn^{2+} kultiviert wurden. Interessanterweise sind diese deNovo induzierten Integrin Cluster ausschließlich auf dem Ligand Vn lokalisiert (Abb. 3.7 a,b,c) und zeigen nur 5.1% Kolo-kalisation mit Fn (Abb. 3.7 d). Eine Charakterisierung dieser zentralen Integrin Cluster mithilfe immunhistochemischer Färbung ergibt, dass sie nur Talin rekrutieren (Abb. 3.7 a) und weder Kontakt zu Vinculin (Abb. 3.7 b) noch zu Aktin (Abb. 3.7 c) haben. Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese zentralen Cluster nicht mechanisch an das Aktin-Zytoskelett gekoppelt sind und somit unter geringer Zugspannung stehen. Unter diesem Kraft Regime scheint ausschließlich Vn-Bindung möglich zu sein aber keine Fn-Bindung. Der Effekt korreliert damit stark mit dem Blebbistatin Experiment bzw. dem Vinculin *Knockout* Experiment.

Trotz dieser eindeutigen Lokalisation auf Vn ist es natürlich möglich, dass deNovo induzierte Integrin Cluster prinzipiell auf Fn entstehen können. Auf Fn/Vn Substraten könnte demnach die unterschiedliche Bindungsaffinität (Fn vs. Vn) dafür verantwortlich sein, dass diese Cluster ausschließlich auf Vn beobachtet wurden. Um dies zu überprüfen wurden 3T3low Zellen mit $\beta 3$ -wt GFP transfiziert und auf homogen beschichteten Fn bzw. Vn Substraten in Anwesenheit von Mn^{2+} kultiviert (-FCS). Auf den Fn-Substraten ist, wie bereits in Abb. 3.1 beschrieben, ein erhöhtes GFP Signal von nicht-geclustertem $\beta 3$ -Integrin im Zellzentrum zu erkennen. Mn^{2+} -Aktivierung ist aber nicht in der Lage die Bildung von deNovo Integrin Clustern auf Fn zu induzieren (Abb. 3.8 a). Auf homogen beschichtetem Vn dagegen sind nach Mn^{2+} -Behandlung zahlreiche punktförmige deNovo induzierte Integrin Cluster im Zellzentrum zu erkennen (Abb. 3.8 b). Es scheint demnach als können solche Cluster, die nicht mechanisch an das Aktin Zytoskelett gekoppelt sind, nur auf Vn induziert werden aber nicht auf Fn.

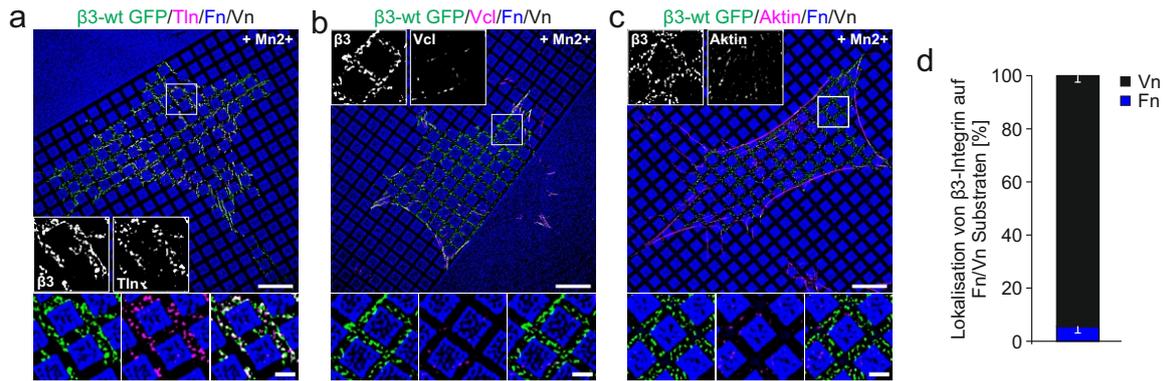


Abbildung 3.7: **Integrin Aktivierung induziert zentrale Integrin Cluster, die ausschließlich Vn binden.**

(a-c) 3T3low Zellen wurden mit $\beta 3$ -wt GFP (grün) transfiziert und für zwei Stunden auf Fv/Vn Substraten (Fn in blau) kultiviert. 30 Minuten vor Fixierung wurde 1 mM $MnCl_2$ in das Kulturmedium gegeben. Aktivierung von Integrinen mit Mn^{2+} führt zur Bildung von punktförmigen, deNovo induzierten Integrin Clustern im Zellzentrum. Diese Cluster sind ausschließlich auf Vn lokalisiert. Die immunhistochemische Färbung zeigt zudem (a) Talin (magenta) oder (b) Vinculin (magenta) oder (c) Aktin (magenta). DeNovo induzierte Integrin Cluster zeigen nur Kolokalisation mit Talin aber nicht mit Vinculin oder Aktin. Maßstab: Übersicht 10 μm , Vergrößerungen 2 μm .

(d) Quantifizierung der Lokalisation von zentralen $\beta 3$ -Integrin Clustern mit Fn. Es wurden ausschließlich zentrale, DeNovo induzierte Integrin Cluster analysiert, die nicht mit Paxillin kolokalisieren, um diese Art von Adhäsion von den peripheren Adhäsionen abzugrenzen. Die zentralen Integrin Cluster sind fast ausschließlich auf Vn lokalisiert. N=3, n=42

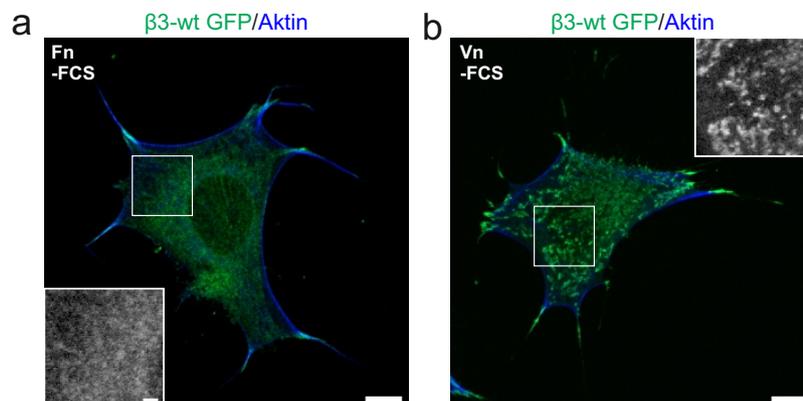


Abbildung 3.8: **DeNovo induzierte Integrin Cluster können nur auf Vn gebildet werden und nicht auf Fn.**

(a-b) 3T3low Zellen wurden mit $\beta 3$ -wt GFP (grün) transfiziert und für zwei Stunden auf homogen beschichtetem Fn (a) bzw. Vn (b) ohne FCS im Medium kultiviert. Zur Induzierung von zentralen DeNovo Integrin Clustern, wurde 30 Minuten vor Fixierung 1 mM $MnCl_2$ in das Kulturmedium gegeben. Aktin (blau) wurde immunhistochemisch visualisiert. DeNovo induzierte Integrin Cluster können ausschließlich auf dem Liganden Vn gebildet werden und nicht auf Fn. Übersicht 10 μm , Vergrößerungen 2 μm .

3.6 MYOSINIIA ÜBEREXPRESSION ERHÖHT DIE LOKALISATION VON α V β 3-INTEGRIN AUF FIBRONEKTIN

Reduzierung der Kontraktilität führt demnach zu einer starken Selektivität von α V β 3-Integrin für den Liganden Vn. Was passiert aber, wenn man die zelluläre Kontraktilität erhöht? Kann dadurch der gegenteilige Effekt, also eine erhöhte Fn-Bindung von α V β 3-Integrin erreicht werden?

Um dies zu überprüfen wurde nach einer Möglichkeit gesucht die intrazelluläre Kontraktilität und damit den lateralen Zug auf Integrine zu erhöhen. Eine Strategie war die Überexpression von α -actinin. Dieses Protein ist vor allem als Aktin Bindeprotein und für seine Funktion als Quervernetzer von Aktin Filamenten bekannt [238–240]. α -actinin Rekrutierung in Fokalkontakte korreliert zudem mit erhöhter Kraftübertragung von Zellen auf das unterliegende Substrat [45]. Damit könnte α -actinin ein geeigneter Kandidat sein, um die zelluläre Kontraktilität zu erhöhen. 3T3low Zellen wurden mit β 3-wt GFP und α -actinin RFP transfiziert und auf Fn/Vn Substraten kultiviert. Eine zusätzliche Aktin-Färbung war technisch leider nicht möglich aber es sieht so aus als würde α -actinin vor allem an Aktin-Bündeln lokalisieren. Außerdem ist α -actinin mit den Enden von Zell-Matrix Adhäsionen assoziiert (Abb. 3.9 a). Quantifiziert man die Lokalisation von β 3-wt auf den Proteinsubstraten wird deutlich, dass kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle besteht. Die Kolokalisation mit Fn liegt bei 17.2 % (Abb. 3.9 c). α -actinin Überexpression hat also keinen Einfluss auf die differenzielle Ligandenbindung von α V β 3-Integrin. Ein zweiter Ansatz, um die zelluläre Kontraktilität zu erhöhen war eine Überexpression von nicht-muskulärem MyosinIIA (NMIIA). Myosine sind aktin gebundene Motorproteine. Vor allem die Isoform NMIIA besitzt wichtige Funktion in der Generierung kontraktiler Kräfte durch Quervernetzung und Kontraktion von Aktinfilamenten [241, 242]. Daher wurde eine Doppeltransfektion mit β 3-wt GFP und NMIIA-mCherry in 3T3low Zellen durchgeführt. NMIIA lokalisiert vor allem am Aktin Zytoskelett, zeigt aber auch teilweise Kolokalisation mit β 3-wt Integrin (Abb. 3.9 b). Eine Quantifizierung der Lokalisation von β 3-wt Integrin ergibt 25.1 % Kolokalisation mit Fn (Abb. 3.9 c). Damit zeigt sich eine signifikant erhöhte Fn-Bindung im Vergleich zur Kontrolle. Grund ist vermutlich eine erhöhte intrazelluläre Kontraktilität durch NMIIA Überexpression. Zusammenfassend kann durch Aktin/Myosin Kontraktilität die Fn vs. Vn von α V β 3-Integrin reguliert werden. Reduzierung der Kontraktilität führt zu starker Selektivität für den Liganden Vn. Eine Erhöhung zellulärer Kräfte erhöht die Promiskuität von α V β 3-Integrin und es kann zusätzlich der Ligand Fn gebunden werden.

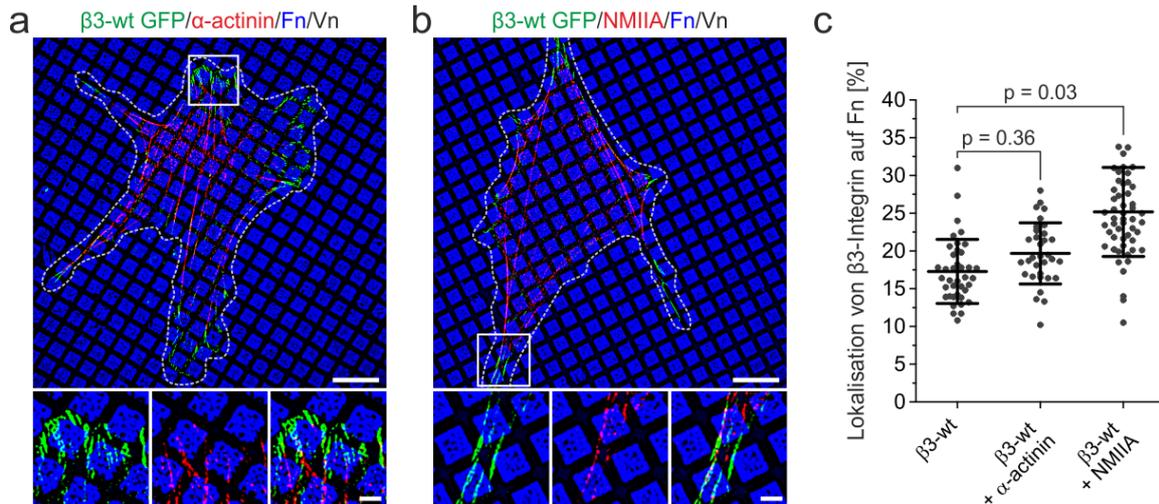


Abbildung 3.9: **Erhöhung zellulärer Kontraktilität erhöht die Bindung von $\alpha V \beta 3$ -Integrin an Fn.**

(a) 3T3low Zellen wurden in einer Doppeltransfektion mit $\beta 3$ -wt GFP (grün) und α -actinin RFP (rot) transfiziert. Zellen wurden für zwei Stunden auf Fn/Vn Substraten (Fn in blau) kultiviert. Die weiße, gestrichelte Linie kennzeichnet den Zellumriss. α -actinin lokalisiert als Aktin-bindendes Protein am Aktin-Zytoskelett (nicht gefärbt) und zeigt auch teilweise Kollokalisierung mit $\beta 3$ -wt-Integrin. Maßstab: Übersicht 10 μ m, Vergrößerung 2 μ m.

(b) Zellen wurden in einer Doppeltransfektion mit $\beta 3$ -wt GFP (grün) und NMMIIA mCherry (rot) transfiziert und wie in (a) behandelt. NMMIIA zeigt vor allem Lokalisation zu Aktin-Fasern (nicht gefärbt) und wird auch teilweise in $\beta 3$ -wt vermittelte Adhäsionen rekrutiert. Maßstab: Übersicht 10 μ m, Vergrößerung 2 μ m.

(c) Quantifizierung der Kollokalisierung von $\beta 3$ -wt Integrin mit Fn für die jeweiligen Konditionen. Zum Vergleich ist die wt-Kontrolle aus Abb. 3.3 erneut gezeigt. Überexpression von α -actinin hat keinen signifikanten Effekt auf die differenzielle Ligandenbindung von $\beta 3$ -Integrin. Die Kollokalisierung mit Fn liegt bei 17.2 %. Überexpression von NMMIIA erhöht die Kollokalisierung von $\beta 3$ -Integrin mit Fn auf 25.1 %. $\beta 3$ -wt + α -actinin: N=3, n=33; $\beta 3$ -wt + NMMIIA: N=3, n=55

3.7 EIN KONSTITUTIVER SWING-OUT DER HYBRID-DOMÄNE ERHÖHT DIE LOKALISATION VON $\alpha V \beta 3$ -INTEGRIN AUF FIBRONEKTIN

Zelluläre Kräfte regulieren also die differenzielle Ligandenbindung von $\alpha V \beta 3$ -Integrin. Wie ist aber der genaue Mechanismus hinter diesem Effekt? In der Literatur ist weitgehend anerkannt, dass mechanische Kräfte einen Einfluss auf die Funktion Integrin-vermittelter Adhäsionen haben [89, 114, 243, 244]. Simulationen zeigen beispielsweise, dass Aktin/Myosin Kontraktilität den *Swing-out* der Hybrid Domäne induziert und das Integrin dadurch in eine maximal aktivierte Konformation bringt [151–153]. Es wäre also möglich, dass mechanische Kraft die Konformation von $\alpha V \beta 3$ -Integrin reguliert und je nach Integrin Konformation könnte die Ligandenbindung variieren.

Um zu überprüfen ob die Konformation einen Einfluss auf die differenzielle Ligandenbindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin hat, wurden Experimente mit $\beta 3$ -N305T (etablierte Integrin Mutation) durchgeführt. Bei dieser Mutante entsteht durch Punktmutation ein Glykosylierungsmotiv (NIT), wodurch ein Glykan Keil an Position N303 in der Integrin Struktur eingeführt wird. In der Literatur ist weitgehend anerkannt, dass dieser Glykan Keil einen konstitutiven *Swing-out* der Hybrid-Domäne induziert und somit das Integrin in die vollständig aktivierte, EO-Konformation bringt [237, 245]. Eine Konformationsänderung in die geschlossene Konformation ist aufgrund der sterischen Hinderung durch den Glykan Keil vermutlich nicht mehr möglich (Abb. 3.10 a). Auf Fn/Vn Substraten sind die peripheren Adhäsionen dieser Mutante sowohl auf Vn als auch auf Fn lokalisiert (Abb. 3.10 b, Vergrößerung 1). Eine Quantifizierung ergibt 27% Kolo-kalisation mit Fn und damit eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur wt-Kontrolle (Abb. 3.10 c). Lebendzellmikroskopie mit $\beta 3$ -N305T GFP transfizierten Zellen zeigt zudem, dass der Großteil aller initialen Adhäsionen auf Vn entsteht. Dennoch können wenige Adhäsionen auch auf Fn gebildet werden (durchschnittlich 13 Adhäsionen pro Zelle; Abb. 3.10 d,e). In der wt-Kontrolle konnte in keinem der unabhängigen Experimente eine Kontaktentstehung auf Fn beobachtet werden (s. Abb. 3.5 a). Zusammenfassend zeigt sich, dass die mutationsbedingte Auslenkung der Hybrid Domäne in $\beta 3$ -N305T den gleichen zellulären Effekt hat wie Erhöhung der Aktin/Myosin Kontraktilität. In beiden Fällen zeigt sich eine erhöhte Kolo-kalisation mit dem Liganden Fn.

Ein unerwarteter Effekt dieser Mutante zeigt sich im Zellzentrum. Durch die erhöhte Aktivierung konnten erneut zentrale, deNovo induzierte Integrin Cluster beobachtet werden (Abb. 3.10 b, Vergrößerung 2). Diese lokalisieren aber ausschließlich auf dem Liganden Vn. Eine Erhöhung der Fn-Lokalisation scheint also nur in den maturierten, peripheren Adhäsionen der Fall zu sein. Zentrale deNovo Cluster von $\beta 3$ -N305T sind wie in Experimenten zuvor ausschließlich auf Vn beschränkt (s. Abb. 3.8).

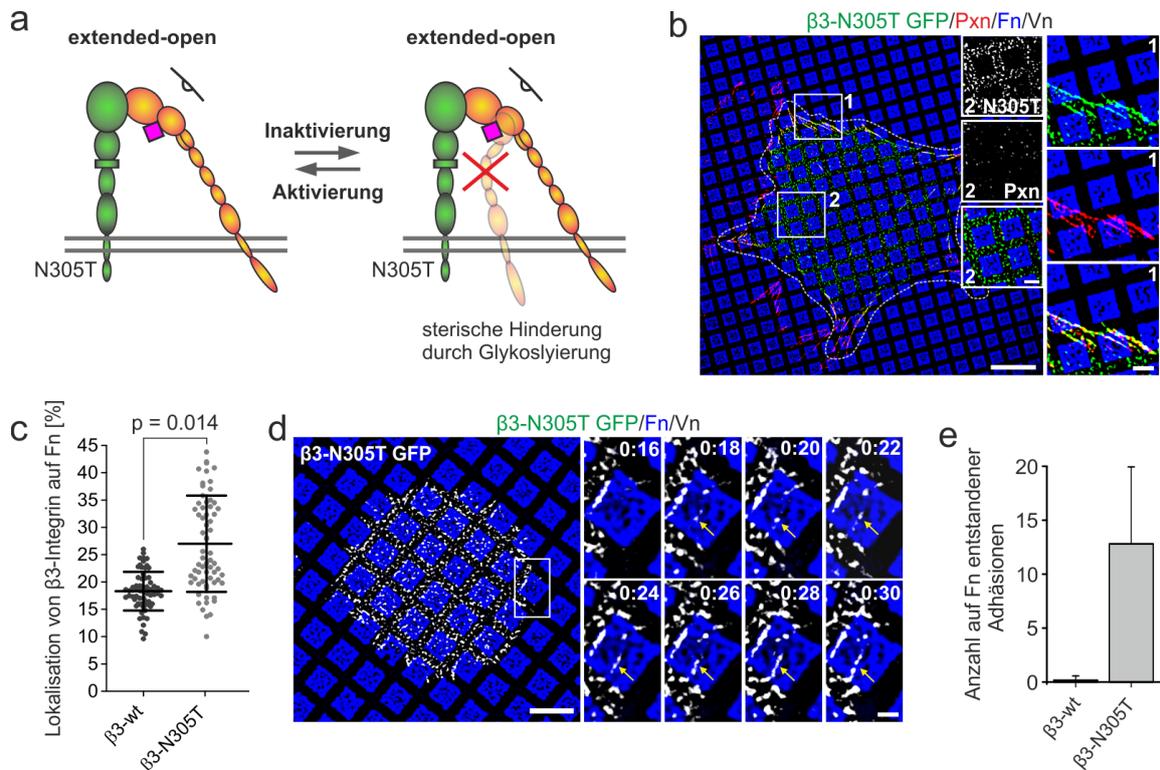


Abbildung 3.10: Ein *Swing-out* der Hybrid Domäne ist notwendig für eine Fn-Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin.

(a) Schematische Darstellung der Integrin Mutante $\beta 3$ -N305T. Die Punktmutation führt zu einer Glykosylierung an Position N303. In der Literatur ist anerkannt, dass der Glykan Keil einen konstitutiven *Swing-out* der Hybrid Domäne induziert und das Integrin in die EO-Konformation bringt. Konformationsänderung in die EC-Konformation durch beispielsweise reduzierte Kontraktilität ist vermutlich nicht mehr möglich. Der Glykan Keil zwischen der βA Domäne und der Hybrid Domäne sorgt für sterische Interaktionen und verhindert ein Einklappen der Hybrid-Domäne.

(b) 3T3low Zellen wurden mit $\beta 3$ -N305T GFP (grün) transfiziert und für zwei Stunden auf Fn/Vn Substraten (Fn in blau) kultiviert. Paxillin (rot) wurde immunhistochemisch angefärbt. Die weiße, gestrichelte Linie kennzeichnet den Zellumriss. Vergrößerung 1 zeigt periphere Adhäsionen der Zelle, Vergrößerung 2 zeigt zentrale Adhäsionen. Maßstab: Übersicht 10 μm , Vergrößerungen 2 μm .

(c) Quantifizierung der Kolokalisation mit Fn. Die konstitutive Auslenkung der Hybrid Domäne in $\beta 3$ -N305T führt zu erhöhter Kolokalisation mit Fn im Vergleich zur Kontrolle. $N=4$, $n=66$

(d) 3T3low Zellen wurden mit $\beta 3$ -N305T GFP (weiss) transfiziert und auf Fn/Vn Substraten ausgesät. Mit SIM-Lebendzellmikroskopie wurde die Kontaktenstehung während der Zellausbreitung beobachtet. Die gelben Pfeile verfolgen eine $\alpha V\beta 3$ -vermittelte Adhäsion, die auf Fn entsteht und reift. Im Maßstab: Übersicht 10 μm , Vergrößerungen 2 μm .

(e) Anzahl der $\beta 3$ -N305T Adhäsionen, die auf Fn entstehen. Zum Vergleich ist die $\beta 3$ -wt Kontrolle aus Abb. 3.4 e erneut gezeigt. $\beta 3$ -N305T ist in der Lage initiale Adhäsionen auf Fn zu bilden. (durchschnittlich 13 Adhäsionen pro Zelle;). Ausgewertet wurden insgesamt 6 Zellen aus 4 unabhängigen Experimenten ($N=4$).

3.7.1 OHNE MECHANISCHE KRAFT IST DIE KONFORMATIONSÄNDERUNG IN β 3-N305T NICHT AUSREICHEND FÜR FIBRONEKTIN BINDUNG

Was könnte also den Unterschied in der Lokalisation zwischen peripheren bzw. zentralen deNovo induzierten Clustern von β 3-N305T ausmachen? Wie in Kapitel 3.5.1 gezeigt, sind DeNovo induzierte Integrin Cluster im Gegensatz zu den peripheren Adhäsionen nicht bzw. nur unter sehr geringer Zugspannung. Ist der Glykan-Keil in β 3-N305T also alleine nicht ausreichend für eine erhöhte Fn-Lokalisation und wird zusätzlich mechanische Kraft benötigt?

Um experimentell den Effekt der mutationsbedingten Konformationsänderung ohne mechanische Krafteinwirkung zu untersuchen, wurden β 3-N305T GFP transfizierte 3T3low Zellen mit Blebbistatin behandelt. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten wurden mikroskopische Aufnahmen mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie erstellt (anstatt mit SIM). Grund war ein Defekt des Elyra PS1 Prototyps. Damit die Ergebnisse vergleichbar sind, wurden auch Kontrollen mit β 3-wt sowie mit β 3-N305T transfizierten Zellen wiederholt und mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Für beide Konditionen wurde erneut die Kolokalisation der jeweiligen β 3-Integrin Variante mit Fn ausgewertet (Abb. 3.11 b). Sowohl für β 3-wt (21.8 % (konventionell) im Vergleich zu 16.5 % (SIM)) als auch für β 3-N305T (37.1 % (konventionell) im Vergleich zu 27 % (SIM)) war eine höhere Kolokalisation mit Fn messbar. Der relative Unterschied zwischen beiden Konditionen ist allerdings nicht beeinflusst. Damit zeigt sich, dass die Mikroskopie Methode keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat.

Analysiert man nun die peripheren Adhäsionen von β 3-N305T ist trotz Blebbistatin Behandlung ein teilweise maturierter Phänotyp der peripheren Adhäsionen zu erkennen (Abb. 3.11 a). Es sind also nicht ausschließlich punktförmige *nascent adhesions* zu beobachten, wie es bei β 3-wt transfizierten Zellen nach Blebbistatin Behandlung der Fall war (s. Abb. 3.6 a). Allerdings ist die Lokalisation von β 3-N305T auf Fn in Abwesenheit kontraktile Kräfte stark reduziert. Eine Quantifizierung ergibt 7.4% Kolokalisation mit Fn (Abb. 3.11 b). Dies ist signifikant unterschiedlich zur unbehandelten β 3-N305T Kontrolle. Damit zeigen periphere Adhäsionen der glykosylierten Mutante ohne mechanische Krafteinwirkung das gleiche Lokalisationsmuster wie die zentralen deNovo induzierten Cluster. In beiden Fällen kann eine starke Selektivität für Vn beobachtet werden.

Die Ergebnisse lassen also vermuten, dass die mutationsbedingte Konformationsänderung durch den Glykan Keil in β 3-N305T nicht ausreichend für eine Fn-Bindung ist. Das Integrin braucht zusätzlich Aktin/Myosin Kontraktilität, um Adhäsionen auf dem Liganden Fn zu bilden.

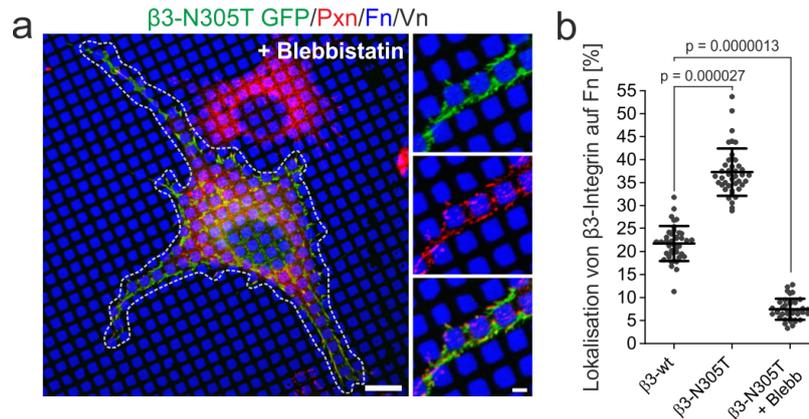


Abbildung 3.11: **β 3-N305T-Integrin benötigt mechanische Kraft für effektive Fn-Bindung.**

(a) 3T3low Zellen wurden mit β 3-N305T GFP (grün) transfiziert und für zwei Stunden auf Fn/Vn Substraten (Fn in blau) kultiviert. Die Aktin/Myosin Kontraktilität wurde durch Einsatz des Myosin Inhibitors Blebbistatin ($10 \mu\text{M}$) reduziert. Paxillin (rot) wurde immunhistochemisch visualisiert. Die gestrichelte Linie zeigt den Zellumriss. β 3-vermittelte Adhäsionen in der Zellperipherie zeigen trotz Blebbistatin Behandlung einen teilweise maturierten Phänotyp. Maßstab: Übersicht $10 \mu\text{m}$, Vergrößerungen $2 \mu\text{m}$.

(b) Quantifizierung der Kolokalisation mit Fn für die angegebenen Konditionen. Alle Bilder wurden mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Für vergleichbare Ergebnisse wurden Experimente mit β 3-wt (21.8 % Kolokalisation mit Fn) und β 3-N305T wiederholt (37.1 % Kolokalisation mit Fn). Blebbistatin Behandlung führt zu stark reduzierter Kolokalisation von β 3-N305T mit dem Liganden Fn. Die Konformationsänderung durch den Glykan Keil an Position N303 ohne mechanische Kraft ist nicht ausreichend für eine effektive Fn-Bindung. β 3-wt: $N=3$, $n=40$; β 3-N305T: $N=3$, $n=42$; β 3-N305T + Blebb: $N=3$, $n=39$.

3.7.2 DIE GLYKOSYLIERUNG IN β 3-N305T FÜHRT NICHT ZU MAXIMALER AKTIVIERUNG

Die Beobachtungen mit β 3-N305T Integrin in Abwesenheit kontraktile Kräfte sind insofern überraschend, da diese Mutante in der Literatur als vollständig aktiviert beschrieben wurde. Entsprechend der Hypothese dieser Arbeit sollte eine maximal aktivierte Konformation von α V β 3 den Ligand Fn unabhängig von mechanischen Kräften binden können. Es stellt sich also die interessante Frage nach der tatsächlichen Konformation von β 3-N305T Integrin: Wird durch den Glykan Keil an Position N303 die maximale Aktivierung (EO-Konformation) erreicht oder nicht?

Der Einfluss der Glykosylierung auf die Integrin Konformation wurde mit Molekulardynamik-Simulationen genauer untersucht. Diese Simulationen wurden von Vasyly Mykuliak (Universität Tampere, Finnland) durchgeführt. Dabei wurde die Kristallstruktur eines FnIII₁₀ gebundenen α V β 3-Integrin (PDB: 4MMX überlagert mit PDB: 3ZE1) verwendet und mit einer Glykosylierung an Position N303 modifiziert. Dieselbe Struktur ohne Glykosylierung

diente als Kontrolle. Nach 100 ns Simulation ist die Auslenkung der Hybrid Domäne sowohl in der glykosylierten Form (rot) als auch in der nicht-glykosylierten Kontrolle (blau) nahezu gleich. Die Struktur zu Beginn der Simulation ist in grau dargestellt (Abb. 3.12 a). Eine Quantifizierung über einen Zeitraum von 100 ns zeigt, dass in beiden Konditionen etwa 70° Auslenkung der Hybrid Domäne erreicht werden, allerdings ist die Auslenkung in der glykosylierten Form stabiler (Abb. 3.12 b). Die Simulationen wurden ohne den Einfluss mechanischer Kraft durchgeführt und entsprechen daher dem Experiment mit reduzierter Aktin/Myosin Kontraktilität (s Abb. 3.11 a). Die simulierte Konformation des glykosylierten Integrins wurde zudem mit zwei publizierten Konformationen der finalen Integrin Aktivierung verglichen wie sie von Zhu und Kollegen für α IIb β 3-Integrin vorgeschlagen wurden (PDB: 3ZE2 bzw. 3FCU) [129, 153]. Für beide vollständig aktivierten Integrin Konformationen (Abb. 3.12 c, “komplett aktiviert 1“ und “komplett aktiviert 2“) ist der Auslenkungswinkel der Hybrid Domäne größer als für die glykosylierte Form.

Zusammenfassend kann die Glykosylierung an Position N303 das Integrin nicht in eine vollständig aktivierte Konformation bringen. Eine maximale Auslenkung der Hybrid Domäne wie sie für die finale Aktivierung vorgeschlagen wurde, wird nicht erreicht. Es scheint als sei für eine maximale Aktivierung dieser Mutante zusätzlich mechanische Kraft erforderlich.

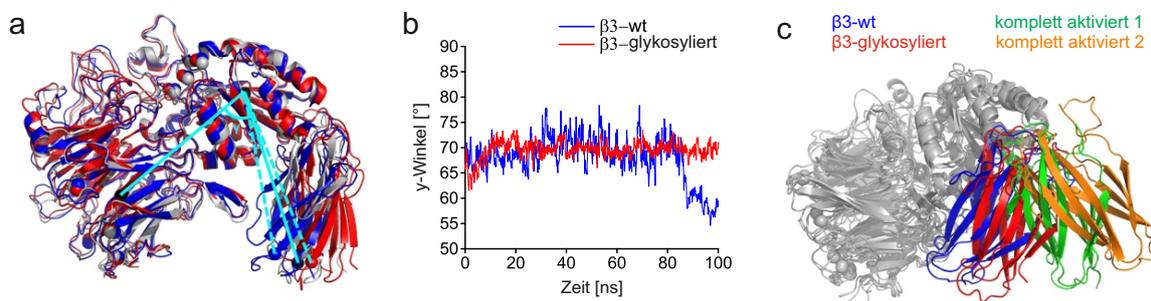


Abbildung 3.12: β 3-N305T-Integrin ist nicht in der maximal aktivierten Konformation.

(a) Überlagerung der Startstruktur von α V β 3-Integrin (grau), der Startstruktur nach 100 ns Molekulardynamik-Simulation (blau) und der glykosylierten Struktur an Position N303 nach 100 ns MD Simulation (rot). Die Linien in cyan kennzeichnen die einzelnen Positionen für die Messungen der Auslenkung der Hybrid Domäne relativ zur β 3A-Domäne (γ -Winkel).

(b) Auslenkung der Hybrid Domäne relativ zur β 3A-Domäne über einen Zeitraum von 100 ns MD Simulation. Gezeigt ist die Fluktuation des γ -Winkels. Sowohl β 3-wt als auch die glykosylierte Variante erreichen den gleichen Auslenkungswinkel. Die Auslenkung für die glykosylierte Form ist stabiler.

(c) Vergleich der Strukturen wie in (a) beschrieben mit zwei publizierten Strukturen von α V β 3-Integrin in der EO-Konformation (komplett aktiviert 1 und 2). Für die beiden komplett aktivierten Strukturen wurde für ein FnIII₁₀-gebundenes α V β 3-Integrin (PDB: 4MMX) eine Auslenkung der Hybrid Domäne nach PDB: 3ZE2 (grün) oder PDB: 3FCU (orange) eingerichtet. In beiden komplett aktivierten Integrin Strukturen ist die Auslenkung der Hybrid-Domäne größer als für die glykosylierte Form.

3.8 INTEGRIN INAKTIVIERUNG DURCH Ca^{2+} REDUZIERT DIE LOKALISATION VON $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -INTEGRIN AUF FIBRONEKTIN

Die bisherigen Daten zeigen, dass eine geöffnete Konformation ($\beta\text{3-N305T}$ + mechanische Kraft) die Promiskuität von $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin erhöht: neben Vn kann auch Fn gebunden werden. Im Gegensatz dazu konnte $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin in Abwesenheit mechanischer Kräfte nur Vn binden. Dies könnte im Umkehrschluss bedeuten, dass das Integrin ohne Einfluss von Kontraktilität in einer geschlossenen Konformation vorliegt und in dieser Form nur Vn binden kann.

Ein erstes Indiz für diese Überlegung stammt aus Experimenten mit Ca^{2+} Titration. Ca^{2+} ist bekannt als Integrin Inaktivator und es wird vermutet, dass eine hohe Ca^{2+} Konzentration Integrine in der inaktiven, geschlossenen Konformation stabilisiert [133, 177, 246]. Es wurden verschiedene Konzentrationen getestet und final wurde 1 mM Ca^{2+} eingesetzt. Auf Fn/Vn Substraten zeigt sich ein deutlicher Effekt nach Behandlung von $\beta\text{3-wt}$ GFP transfizierten Zellen mit Ca^{2+} : Die peripheren Adhäsionen erscheinen kleiner und weniger maturiert als in der Kontrolle. Zudem ist β3 -Integrin stark auf die Vn Bereiche beschränkt (Abb. 3.13 a). Die Kolokalisation mit Fn beträgt 9.3 % und ist damit im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (Abb. 3.13 b).

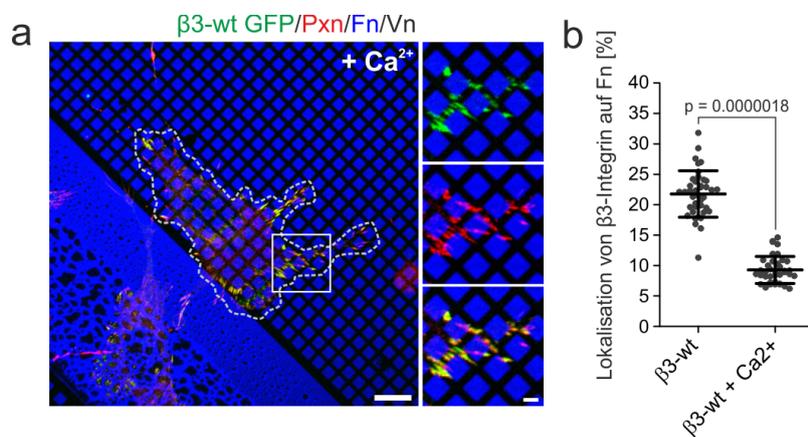


Abbildung 3.13: **Integrin Inaktivierung mit Ca^{2+} reduziert Fn-Bindung von $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin.**

(a) 3T3low Zellen wurden mit $\beta\text{3-wt}$ GFP (grün) transfiziert und für zwei Stunden auf Fn/Vn Substraten (Fn in blau) kultiviert. Zur Inaktivierung von $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin wurde 30 Minuten vor Fixierung 1 mM Ca^{2+} in das Kulturmedium gegeben. Paxillin (rot) wurde immunhistochemisch visualisiert. Die gestrichelte Linie zeigt den Zellumriss. Maßstab: Übersicht 10 μm , Vergrößerungen 2 μm .

(b) Quantifizierung der Kolokalisation von $\beta\text{3-wt}$ mit Fn. Zum Vergleich wurde die wt-Kontrolle aus Abb. 3.3 erneut dargestellt. Inaktivierung von $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin mit Calcium führt zu stark reduzierter Kolokalisation mit Fn. N=3; n=38

3.9 EINE DISULFIDBRÜCKE ZWISCHEN DER β A-DOMÄNE UND DER HYBRID-DOMÄNE HÄLT α V β 3-INTEGRIN IN DER GESCHLOSSENEN KONFORMATION

Ca²⁺ Titration ist allerdings nur ein indirekter Beweis, dass die inaktive, geschlossene Konformation von α V β 3-Integrin ausschließlich Vn bindet. Über die tatsächliche Konformation der Integrin Population nach Ca²⁺-Behandlung lässt sich in diesem Assay keine Aussage treffen. Die Arbeitsgruppe von Bernhard Wehrle-Haller (Universität Genf) hat daher eine neue Integrin Mutation etabliert, die α V β 3-Integrin in der geschlossenen Konformation (EC) blockiert. Grundlage sind zwei Punktmutationen an Position V80 in der β A-Domäne und D241 in der Hybrid Domäne. Beide Aminosäuren wurden zu Cysteinen mutiert (V80C/D241C). Dadurch wird eine Disulfidbrücke zwischen der β A-Domäne und der Hybrid-Domäne erzeugt, die eine Auslenkung der Hybrid-Domäne verhindert.

Abbildung 3.14 (a) zeigt Strukturanalysen basierend auf publizierten Kristallstrukturen von α V β 3-Integrin (PDB: 4MMX). Die Strukturanalysen wurden von Vasyly Mykuliak (Universität Tampere) durchgeführt. Dargestellt von links nach rechts ist die Struktur der neuen Mutante (β 3-V80C/D241C), die Wildtyp Struktur in der EC-Konformation (mitte) und α V β 3-Integrin in der EO-Konformation. Für alle drei Strukturen ist jeweils der β -Propeller (grau), die β A-Domäne (cyan) und die Hybrid-Domäne (blau) gezeigt. Die Distanz zwischen den C α Atomen der Aminosäuren V80 und D241 in der EC-Konformation der Wildtyp Struktur (mitte) beträgt 6.3 Å. Wechselt das Integrin in seine EO-Konformation erhöht sich die Distanz zwischen V80 und D241 etwa um das Dreifache auf 19.4 Å (rechts). Diese Auslenkung soll durch das Einfügen einer Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren V80 und D241 verhindert werden. Die Strukturanalysen für die Mutation zeigen, dass eine Disulfidbrücke zwischen den mutierten Aminosäuren V80C und D241C die Distanz im Vergleich zur EC-Konformation des Wildtyps nicht verändert (ebenfalls 6.3 Å (links)). Die Mutation führt demnach zu keiner Verzerrung von α V β 3-Integrin und soll das Integrin in der EC-Konformation blockieren. Schematisch ist der Effekt von β 3-V80C/D241C im Vergleich zu β 3-wt in Abbildung 3.14 (b,c) dargestellt. Das Wildtyp-Integrin kann durch verschiedene Strategien der Integrin Aktivierung (z.B. Erhöhung kontraktile Kräfte) von der EC-Konformation in die EO-Konformation oder dazwischenliegende intermediäre Formen wechseln. Dabei verändert sich der Auslenkungswinkel der Hybrid-Domäne. Dieser Prozess ist reversibel (Abb. 3.13 b). Die Disulfidbrücke in der Mutante β 3-V80C/D241C verhindert eine Auslenkung der Hybrid-Domäne. Das Integrin befindet sich vermutlich in einem konstitutiv geschlossenen Zustand und kann nicht mehr aktiviert werden (Abb. 3.14 c).

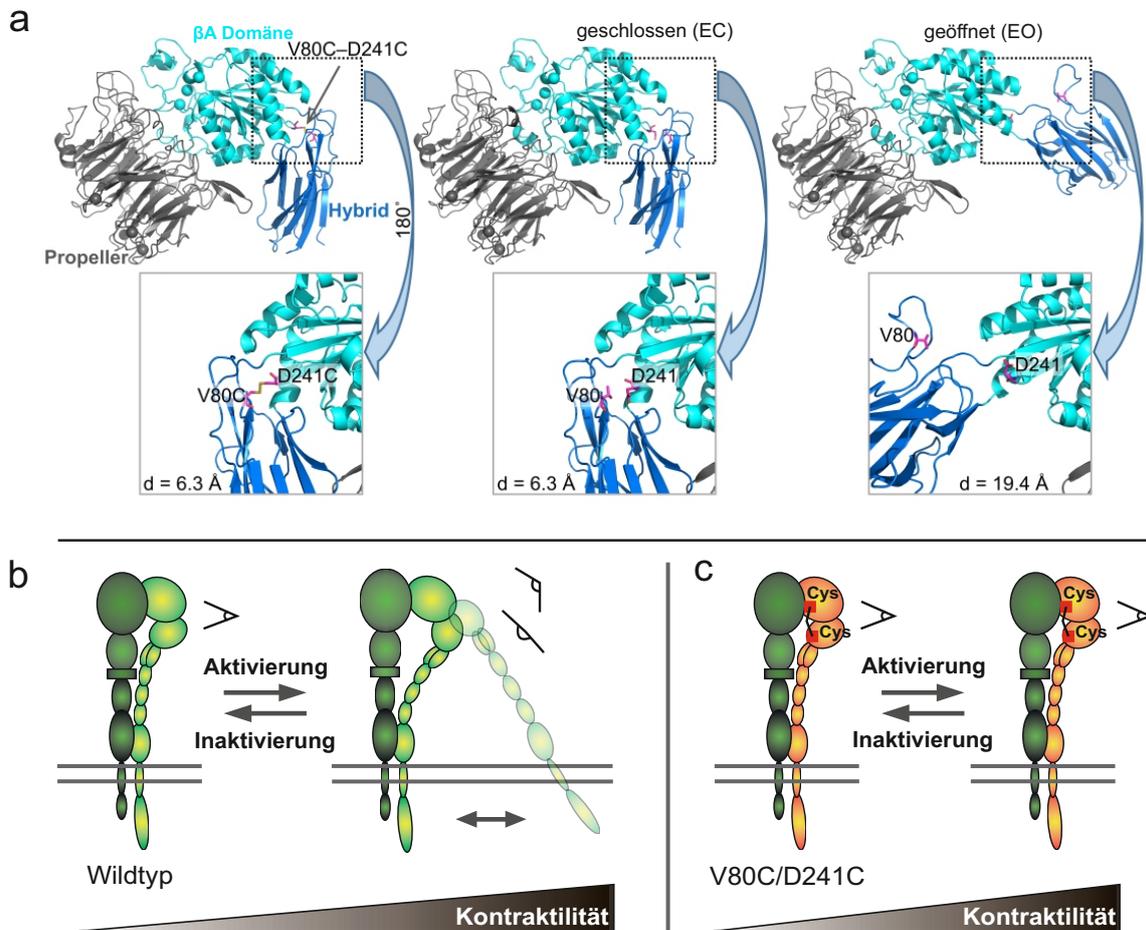


Abbildung 3.14: $\alpha V\beta 3$ -Integrin kann durch eine Disulfidbrücke in der EC-Konformation blockiert werden.

(a) Strukturelle Analyse der Distanz zwischen den Aminosäuren an Position V80 und D241 in der Struktur von $\alpha V\beta 3$ -Integrin. Gezeigt sind die EC-Konformation mit zusätzlicher V80C/D241C Disulfidbrücke (links), die EC-Konformation des Wildtyp-Integrins (mitte) und die EO-Konformation (rechts). Die Distanz zwischen den beiden Aminosäuren an Position 80 und 241 beträgt sowohl für $\beta 3$ -V80C/D241C als auch für das $\beta 3$ -wt 6.3 Å. Die Punktmutationen bewirken keine Veränderung der Integrin Struktur. In der EO-Konformation erhöht sich die Distanz auf 19.4 Å.

(b,c) Schematische Darstellung der Konformation von $\beta 3$ -V80C/D241C (c) im Vergleich zu $\beta 3$ -wt (b). Das $\beta 3$ -Integrin im Wildtyp Zustand zeigt je nach Aktivierungsstatus verschiedene Konformationen mit verschiedenen Positionen der Hybrid Domäne relativ zur βA Domäne (b). Erhöhung der Kontraktilität ist beispielsweise ein Faktor, der den Aktivierungszustand von Integrinen verändert. Mögliche Konformationsänderungen und die entsprechenden Auslenkungswinkel der Hybrid Domäne sind graphisch dargestellt. Die Disulfidbrücke in $\beta 3$ -V80C/D241C verhindert eine Auslenkung der Hybrid Domäne (c). Das Integrin kann vermutlich nicht mehr aktiviert werden und befindet sich auch in Anwesenheit zellulärer Kontraktilität in einem geschlossen Zustand.

3.10 α V β 3-INTEGRIN IN DER EC-KONFORMATION BINDET AUSSCHLIESSLICH AN VITRONEKTIN ABER NICHT AN FIBRONEKTIN

Strukturelle Analysen zeigen also, dass sich β 3-V80C/D241C vermutlich in der geschlossenen Konformation befindet. Verändert sich dadurch auch die differenzielle Ligandenbindung von α V β 3-Integrin? Und kann in dieser geschlossenen Konformation überhaupt noch ein Ligand gebunden werden?

3T3low Zellen wurden mit β 3-V80C/D241C GFP transfiziert und zunächst auf homogen beschichtetem Fn bzw. homogen beschichtetem Vn ausgesät. Zusätzlich wurde Paxillin (rot) als Marker für funktionelle Adhäsionen visualisiert. Auf homogen beschichtetem Fn zeigt die Zelle einen ausgebreiteten Phänotyp mit Paxillin-vermittelten Adhäsionen in der Zellperipherie. Allerdings ist β 3-V80C/D241C nicht in diesen peripheren Adhäsionen lokalisiert und zeigt stattdessen ein starkes Signal um den Zellkern und im Zytoplasma (Abb. 3.15 a). β 3-V80C/D241C kann auf Fn also nicht in periphere Kontakte rekrutiert werden. Eine Auswertung der Fläche von β 3-vermittelten Adhäsionen war daher nicht möglich (Abb. 3.15 c). Für die Kontrolle mit β 3-wt Integrin auf dem Liganden Fn war eine Auswertung möglich. Quantifiziert wurde die Fläche aller β 3-vermittelten Adhäsionen in Relation zur Gesamtfläche der Zelle (1.5 % β 3-Adhäsionsfläche).

Auf homogen beschichtetem Vn dagegen ist eine deutliche Kolo-kalisation von β 3-V80C/D241C mit Paxillin in peripheren Adhäsionen zu erkennen. β 3-V80C/D241C kann also eine Ligandenbindung mit Vn eingehen. Allerdings zeigt sich auch auf Vn ein starkes Signal von nicht-geclustertem β 3-V80C/D241C um den Zellkern und im Zytoplasma. Dies ist untypisch für den Liganden Vn und wurde bisher nur auf Fn beobachtet (s. Abb. 3.1 a,d). Quantifiziert man die Fläche β 3-vermittelter Adhäsionen relativ zur Zellfläche ergibt sich auf Vn für die wt-Kontrolle eine Adhäsionsfläche von 3.4 % und für β 3-V80C/D241C eine Fläche von 1.6 %. Es zeigt sich also eine klare Adhäsionsbildung auf Vn aber im Vergleich zur Kontrolle ist die Fläche β 3-V80C/D241C-vermittelter Adhäsionen um etwa die Hälfte reduziert.

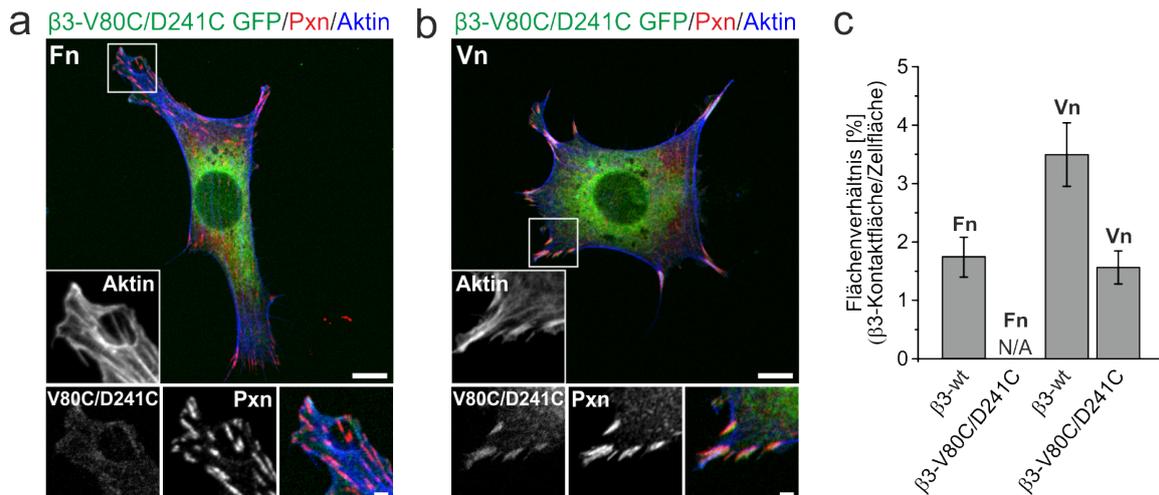


Abbildung 3.15: α V β 3-Integrin in der EC-Konformation bindet Vn aber nicht Fn.

(a,b) 3T3low Zellen wurden für β 3-V80C/D241C GFP transfiziert und auf homogen beschichtetem Fn (a) bzw. Vn (b) kultiviert. Paxillin (rot) und Aktin (blau) wurden immunhistochemisch visualisiert. β 3-V80C/D241C Integrin, das in der EC-Konformation blockiert ist, kann nur auf Vn in periphere Adhäsionen rekrutiert werden. Auf Fn ist keine Adhäsionsbildung möglich.

(c) Auswertung der Adhäsionsbildung von β 3-V80C/D241C auf homogen beschichtetem Fn bzw. Vn. Quantifiziert wurde die Fläche β 3-vermittelter Adhäsionen in Relation zur Zellfläche. Das Flächenverhältnis gibt Informationen über die Rekrutierung von α V β 3-Integrin in periphere Adhäsionen. Experimente mit β 3-wt Integrin dienen als Kontrolle. Auf Fn war keine Auswertung β 3-V80C/D241C vermittelter Adhäsionen möglich. Die Mutante wurde nicht in Adhäsionen rekrutiert. Auf Vn ist die Adhäsionsfläche von β 3-V80C/D241C (1.6 %) im Vergleich zur wt-Kontrolle (3.4 %) um etwa die Hälfte reduziert. β 3-wt (Fn): N=3, n=38; β 3-wt (Vn): N=3, n=47; β 3-V80C/D241C: N=3, n=30 (N/A); β 3-V80C/D241C (Vn): N=3, n=28.

3.10.1 β 3-V80C/D241C ZEIGT NACH Mn^{2+} AKTIVIERUNG VERSTÄRKTE REKRUTIERUNG AUF VITRONEKTIN ABER NICHT AUF FIBRONEKTIN

Auf homogen beschichtetem Substrat bindet β 3-V80C/D241C also ausschließlich an den Liganden Vn. Wie verhält sich dieses Integrin aber auf den differentiellen Proteinsubstraten, wenn Vn und Fn gleichzeitig präsentiert werden?

Dafür wurden 3T3low Zellen für β 3-V80C/D241C GFP transfiziert und für zwei Stunden auf den Fn/Vn Substraten kultiviert. Wie auf homogen beschichtetem Substrat zeigen die Zellen einen großen Anteil an nicht-geclustertem Integrin im Zellzentrum und Zytoplasma. In der Zellperipherie ist eine schwache Lokalisation von β 3-V80C/D241C in den Paxillin-positiven Adhäsionen zu erkennen (Abb. 3.16 a). Eine quantitative Analyse war aufgrund des deutlichen Hintergrundsignals und der schwachen Rekrutierung leider nicht möglich. Es scheint aber, dass β 3-V80C/D241C nur auf den Vn-Bereichen in die Kontakte rekrutiert werden kann. Die Differenzierung zwischen Hintergrund und Integrin-vermittelter Adhäsion

war in diesem Experiment aber nicht einfach. Ein kritischer Betrachter könnte argumentieren, dass auch auf den Fn-Bereichen ein Signal von $\beta 3$ -V80C/D241C GFP detektierbar ist. Die Intensität dieses Signals zeigt allerdings Hintergrundlevel während die Intensität auf Vn-Bereichen im Vergleich zum Hintergrund deutlich erhöht ist. Ohne Quantifizierung ergibt sich aber lediglich eine optisch Tendenz, dass $\beta 3$ -V80C/D241C ausschließlich auf dem Liganden Vn lokalisiert ist.

Es wurde also nach einer Lösung gesucht diesen Effekt zu verdeutlichen. In allen Experimenten dieser Arbeit zeigte Mn^{2+} Aktivierung eine erhöhte Integrin Rekrutierung in periphere Adhäsionen. Die Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin an Fn vs. Vn wurde durch Mn^{2+} aber nie verändert. Um zu überprüfen ob dies auch für die EC-Mutante zutrifft, wurden $\beta 3$ -V80C/D241C GFP transfizierte Zellen in Anwesenheit von Mn^{2+} zunächst auf homogen beschichtetem Fn bzw. Vn ausgesät. Auf dem Liganden Vn zeigt sich nach Mn^{2+} Aktivierung ein klarer Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Die Rekrutierung von $\beta 3$ -V80C/D241C in periphere Kontakte ist deutlich verstärkt und auch das Hintergrundsignal ist klar reduziert (Abb. 3.16 d). Damit erhöht sich der Anteil der $\beta 3$ -Adhäsionsfläche von der gesamten Zellfläche um mehr als das Dreifache auf 5.7 % (Abb. 3.16 f). Im Gegensatz dazu zeigt sich auf homogen beschichtetem Fn nach Mn^{2+} Aktivierung kein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. $\beta 3$ -V80C/D241C kann erneut nicht in Paxillin-positive Kontakte der Zellperipherie rekrutiert werden. Stattdessen ist ein starkes Signal um den Zellkern und im Zytoplasma erkennbar (Abb. 3.16 d). Eine Quantifizierung der Adhäsionsfläche von $\beta 3$ -Integrin war erneut nicht möglich. Mn^{2+} Aktivierung hat also nur auf Vn einen Effekt und verstärkt die Rekrutierung von $\beta 3$ -V80C/D241C in periphere Adhäsionen. Eine Fn-Bindung war ohne Mn^{2+} nicht möglich und wurde auch durch Mn^{2+} Behandlung nicht beeinflusst.

Werden nun $\beta 3$ -V80C/D241C GFP transfizierte Zellen auf Fn/Vn Substraten mit Mn^{2+} behandelt, zeigt sich ein sehr ähnlicher Effekt. Im Vergleich zur Kondition ohne Mn^{2+} Aktivierung (Abb. 3.16 a) ist die Rekrutierung von $\beta 3$ -V80C/D241C in periphere Adhäsionen klar verstärkt während der Anteil an nicht-geclustertem Integrin im Zytoplasma reduziert ist (Abb. 3.16 b). Eine quantitative Auswertung war nun ohne Probleme möglich und zeigt eine stark bevorzugte Lokalisation von $\beta 3$ -V80C/D241C auf dem Liganden Vn. Die Kolo-kalisation mit Fn liegt lediglich bei 8.3 % und ist signifikant reduziert im Vergleich zum Wildtyp-Integrin (Abb. 3.16 c). Damit zeigt die EC-Mutation eine ähnliche Fn-Bindung wie $\alpha V\beta 3$ -Integrin nach Inhibierung der Aktin/Myosin Kontraktilität (s. Abb. 3.6 a,b).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin in der EC-Konformation eine Ligandenbindung eingehen kann. Es wird aber ausschließlich Vn gebunden und nicht Fn.

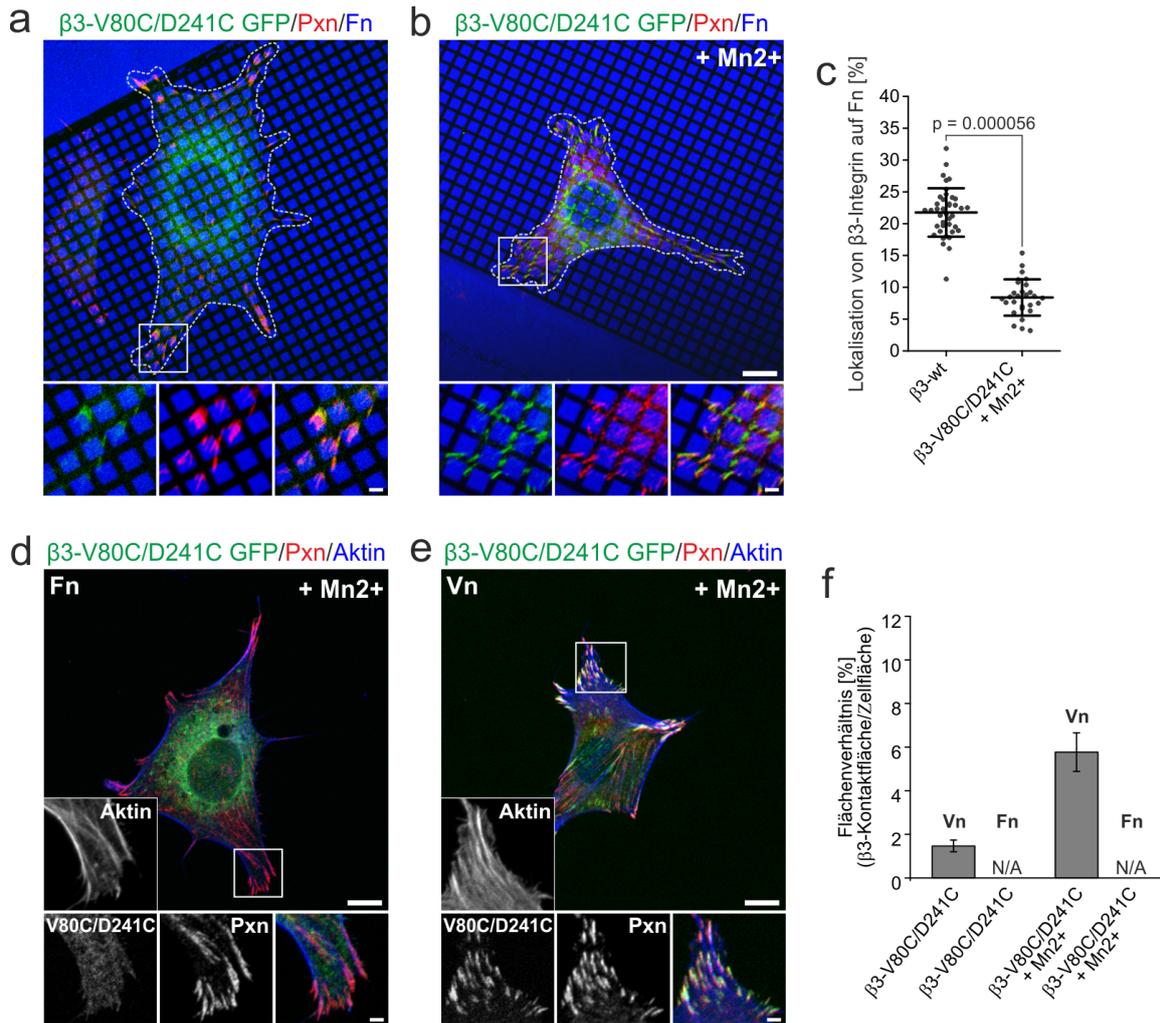


Abbildung 3.16: $\alpha V\beta 3$ -Integrin in der EC-Konformation bindet nach Mn^{2+} Aktivierung ausschließlich an Vn aber nicht an Fn.

(a) 3T3low Zellen wurden für $\beta 3$ -V80C/D241C GFP (grün) transfiziert und auf Fn/Vn Substraten (Fn in blau) kultiviert. Paxillin (rot) als Marker für Fokalkontakte wurde immunhistochemisch visualisiert. $\beta 3$ -V80C/D241C Integrin zeigt die Tendenz Adhäsionen ausschließlich auf Vn Bereichen zu bilden. Eine quantitative Auswertung war aufgrund des starken Hintergrundsignals und der schwachen Rekrutierung von $\beta 3$ -V80C/D241C in periphere Kontakte nicht möglich. Die gestrichelte Linie zeigt den Zellumriss. Maßstab: Übersicht 10 μm , Vergrößerungen 2 μm .

(b) Zellen wurden wie in (a) behandelt. Zur Aktivierung von Integrinen wurde 30 Minuten vor Fixierung 1mM Mn^{2+} ins Medium gegeben. Mn^{2+} Aktivierung führt zu einem reduzierten Signal von $\beta 3$ -V80C/D241C im Zytoplasma und zu einer verstärkten Rekrutierung in periphere Adhäsionen. Die Lokalisation von $\beta 3$ -V80C/D241C beschränkt sich auf die Vn Bereiche während Fn-Bereiche klar vermieden werden.

(c) Quantifizierung der Kolokalisation von $\beta 3$ -V80C/D241C + Mn^{2+} mit dem Liganden Fn. Die Kolokalisation beträgt 8.3 % und ist signifikant reduziert im Vergleich zu $\beta 3$ -wt. $\beta 3$ -V80C/D241C + Mn^{2+} : N=3, n=28.

(d,e) 3T3low Zellen wurden für $\beta 3$ -V80C/D241C GFP transfiziert und auf homogen beschichtetem Vn (d) bzw. Fn (e) kultiviert. 30 Minuten vor Fixierung wurde 1 mM Mn^{2+} zugegeben. Paxillin (rot) und Aktin (blau) wurden immunhistochemisch visualisiert. Mn^{2+} -Aktivierung verstärkt die Clusterbildung von $\beta 3$ -V80C/D241C auf dem Liganden Vn. Auf Fn dagegen ist auch nach Mn^{2+} Aktivierung erneut keine Adhäsionsbildung möglich. Maßstab: Übersicht 10 μm , Vergrößerungen 2 μm .

(f) Auswertung der Adhäsionsbildung von $\beta 3$ -V80C/D241C auf homogen beschichtetem Fn bzw. Vn. Quantifiziert wurde der prozentuale Anteil der $\beta 3$ -Adhäsionsfläche von der Gesamtzellfläche. Auf Fn war keine Rekrutierung von $\beta 3$ -V80C/D241C in periphere Kontakte erkennbar und demnach keine Auswertung möglich. Auf Vn erhöht Mn^{2+} Aktivierung die $\beta 3$ -Adhäsionsfläche um etwa das Dreifache auf 5.7 %. Zum Vergleich sind die Werte für $\beta 3$ -V80C/D241C ohne Mn^{2+} (Abb. 3.15) erneut dargestellt. $\beta 3$ -V80C/D241C + Mn^{2+} (Fn): N=3, n=30; $\beta 3$ -V80C/D241C + Mn^{2+} (Vn): N=3, n=36.

3.11 DAS AUFBRECHEN VON DISULFIDBRÜCKEN ERMÖGLICHT DIE BINDUNG VON $\beta 3$ -V80C/D241C AN FIBRONEKTIN

$\beta 3$ -V80C/D241C, das in der EC-Konformation blockiert ist, zeigt also hohe Selektivität für Vn. Der Ligand Fn wird in dieser Konformation nicht gebunden. Die Disulfidbrücke in $\beta 3$ -V80C/D241C verhindert eine Auslenkung der Hybrid-Domäne und damit einen Wechsel in eine aktivierte Konformation. Dieser Wechsel ist gemäß der Hypothese dieser Arbeit notwendig für eine Fn-Bindung. Damit stellt sich die interessante Frage ob durch Aufbrechen der Disulfidbrücke in $\beta 3$ -V80C/D241C wieder eine Fn-Bindung vergleichbar zu $\beta 3$ -wt erreicht werden kann.

Disulfidbrücken zwischen Cystein Resten können durch Reduktionsmittel wie beispielsweise Dithiothreitol (DTT) aufgebrochen werden. DTT gilt in der Literatur zudem als effektiver Aktivator von Integrinen, indem es zugängliche Disulfidbrücken in der Integrinstruktur reduziert [184, 186, 187]. Das Reduktionsmittel wurde 20 Minuten vor dem Fixierungsschritt (1mM bzw. 10 mM) zu $\beta 3$ -V80C/D241C-transfizierten 3T3low Zellen gegeben. Der Effekt von DTT wurde zunächst auf homogen beschichteten Substraten getestet. Auf homogen beschichtetem Vn zeigt sich nach einer Behandlung mit 1 mM DTT eine deutlich erhöhte Rekrutierung von $\beta 3$ -V80C/D241C-Integrin in periphere Kontakte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zum einen werden mehr Adhäsionen gebildet (5.1 % von der Gesamtfläche), zum anderen scheint die Intensität von $\beta 3$ -V80C/D241C GFP in den Adhäsionen stärker zu sein (Abb. 3.17 a,c). Gleichzeitig ist das Signal von nicht-geclustertem Integrin im Zellzentrum reduziert. DTT Behandlung zeigt auf homogenem Vn also einen identischen Effekt wie Mn^{2+} . Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig. Erhöht man die Konzentration von DTT auf 10 mM zeigen die Zellen ungewöhnlich lange $\beta 3$ -V80C/D241C-vermittelte Adhäsionen in der Zellperipherie. Der Anteil der Adhäsionsfläche von der Gesamtfläche steigt auf 9.4 % (Abb. 3.17 b,c).

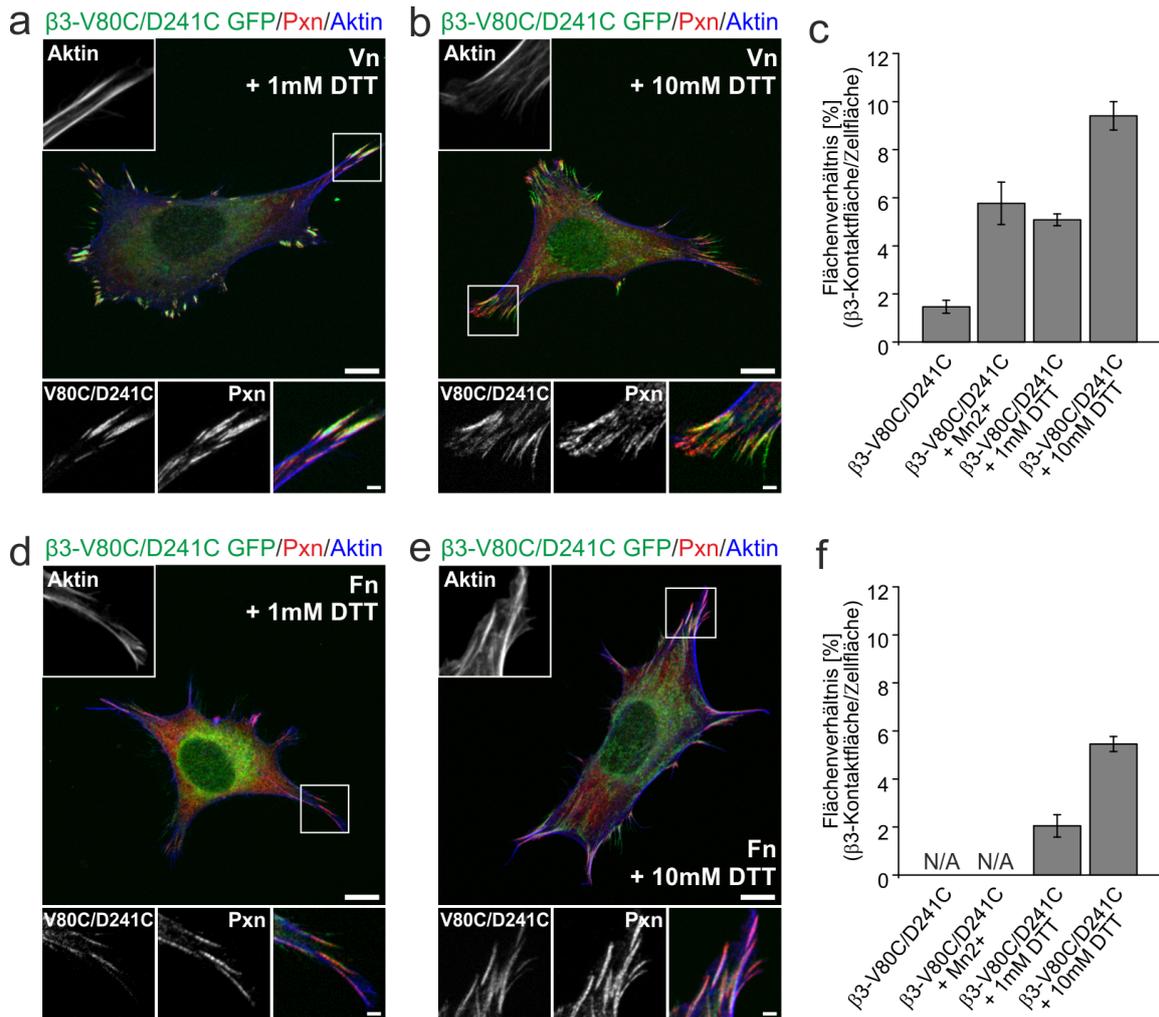


Abbildung 3.17: $\beta 3$ -V80C/D241C kann nach dem Aufbrechen von Disulfidbrücken eine Fn-Bindung eingehen.

(a-b) 3T3low Zellen wurden für $\beta 3$ -V80C/D241C GFP transfiziert und auf homogen beschichtetem Vn kultiviert. Zellen wurden 20 Minuten vor Fixierung mit 1 mM DTT bzw. 10 mM DTT behandelt. Paxillin (rot) und Aktin (blau) wurden immunhistochemisch visualisiert. DTT-Behandlung verstärkt die Bildung $\beta 3$ -V80C/D241C-vermittelter Adhäsionen auf homogen beschichtetem Vn. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig. Maßstab: Übersicht 10 μ m, Vergrößerungen 2 μ m.

(c) Auswertung der Adhäsionsbildung von $\beta 3$ -V80C/D241C auf Vn. Quantifiziert wurde der prozentuale Anteil der Adhäsionsfläche von der Gesamtzellfläche. Für eine bessere Übersicht ist die unbehandelte Kontrolle aus Abb. 3.15 und die Mn^{2+} -behandelte Kondition aus Abb. 3.16 erneut gezeigt. Durch DTT-Behandlung erhöht sich der Anteil der Adhäsionsfläche von der Gesamtzellfläche auf 5.1 % (1 mM DTT) bzw. 9.4 % (10 mM DTT). $\beta 3$ -V80C/D241C + 1mM DTT: N=3, n=32; $\beta 3$ -V80C/D241C + 10mM DTT: N=3, n=32.

(d-e) Zellen wurden wie in (a-b) behandelt und auf homogen beschichtetem Fn kultiviert. DTT Behandlung induziert eine Fn-Bindung von $\beta 3$ -V80C/D241C. Der Effekt ist konzentrationsabhängig. Maßstab: Übersicht 10 μ m, Vergrößerungen 2 μ m.

(f) Quantifizierung wie in (c). $\beta 3$ -V80C/D241C kann nach DTT Behandlung den Ligand Fn binden. Der prozentuale Anteil der Adhäsionsfläche von der Gesamtzellfläche beträgt 2.1 % (1 mM DTT) bzw. 5.4 % (10 mM DTT). $\beta 3$ -V80C/D241C + 1mM DTT: N=3, n=37; $\beta 3$ -V80C/D241C + 10mM DTT: N=3, n=35.

Werden Zellen auf homogen beschichtetem Fn mit 1 mM DTT behandelt kann $\beta 3$ -V80C/D241C plötzlich in periphere Adhäsionen rekrutiert werden (Abb. 3.17 d,e). Dies war ohne DTT-Behandlung nicht zu beobachten (s. Abb. 3.15 a,c). Die Rekrutierung in periphere Adhäsionen ist allerdings schwach und es zeigt sich ein starkes Signal von nicht-geclustertem Integrin im Zentrum der Zelle (Abb. 3.17 d). Der Anteil der Adhäsionsfläche von der Gesamtfläche liegt bei 2.1 % (Abb. 3.17 f). Damit zeigt $\beta 3$ -V80C/D241C nach DTT Behandlung einen ähnlichen Phänotyp und eine ähnliche Adhäsionsfläche wie $\beta 3$ -wt (1.8 %) auf homogen beschichtetem Fn. Eine Erhöhung der DTT-Konzentration auf 10 mM verstärkt diesen Effekt weiter. $\beta 3$ -V80C/D241C bildet bei dieser Konzentration ungewöhnlich lange Adhäsionen in der Zellperipherie während das Signal von nicht-geclustertem Integrin im Zytoplasma reduziert ist. Der Anteil der Adhäsionsfläche von der Gesamtfläche erhöht sich zudem auf 5.4 % (Abb. 3.17 e).

Die Daten auf homogen beschichteten Substraten zeigen, dass eine DTT-Konzentration von 1 mM ausreichend ist, um eine Fn-Bindung von $\beta 3$ -V80C/D241C zu induzieren. Bei dieser Konzentration verhält sich $\beta 3$ -V80C/D241C nahezu wie $\beta 3$ -wt Integrin. Für die Experimente auf Fn/Vn Substraten wurde daher mit einer Konzentration von 1 mM DTT gearbeitet. Erneut wurde DTT erst 20 Minuten vor dem Fixierungsschritt zu $\beta 3$ -V80C/D241C-transfizierten Zellen gegeben. Die Daten zeigen deutlich, dass $\beta 3$ -V80C/D241C nach DTT Behandlung nicht mehr ausschließlich auf Vn beschränkt ist. Es findet auch teilweise Rekrutierung in periphere Adhäsionen auf Fn statt (15.8 %). Vn bleibt dennoch der klar bevorzugte Ligand (Abb. 3.18 b,c). Durch Aufbrechen von Disulfidbrücken kann die Lokalisation der Mutante auf Fn im Vergleich zur unbehandelten Kondition bzw. der Mn^{2+} -behandelten Kondition also klar erhöht werden. Eine Fn-Bindung wie sie bei $\beta 3$ -wt Integrin beobachtet wurde, wird allerdings nicht erreicht (Abb. 3.18 c). Um zu überprüfen ob DTT generell eine erhöhte Fn-Bindung in diesem Assay erlaubt, wurden $\beta 3$ -wt-transfizierte Zellen mit 1 mM DTT behandelt. Die Quantifizierung zeigt für diese Kondition keine erhöhte Lokalisation auf Fn (21.8 %) im Vergleich zur unbehandelten $\beta 3$ -wt Kontrolle. Die erhöhte Lokalisation auf Fn nach DTT-Behandlung scheint also spezifisch für $\beta 3$ -V80C/D241C zu sein.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass $\beta 3$ -V80C/D241C Integrin nach DTT-Behandlung wieder eine Fn-Bindung eingehen kann. Vn bleibt dennoch der klar bevorzugte Ligand. Vermutlich wird durch DTT die stabilisierende Disulfidbrücke zwischen V80C und D241C aufgebrochen, die das Integrin in der EC-Konformation blockiert.

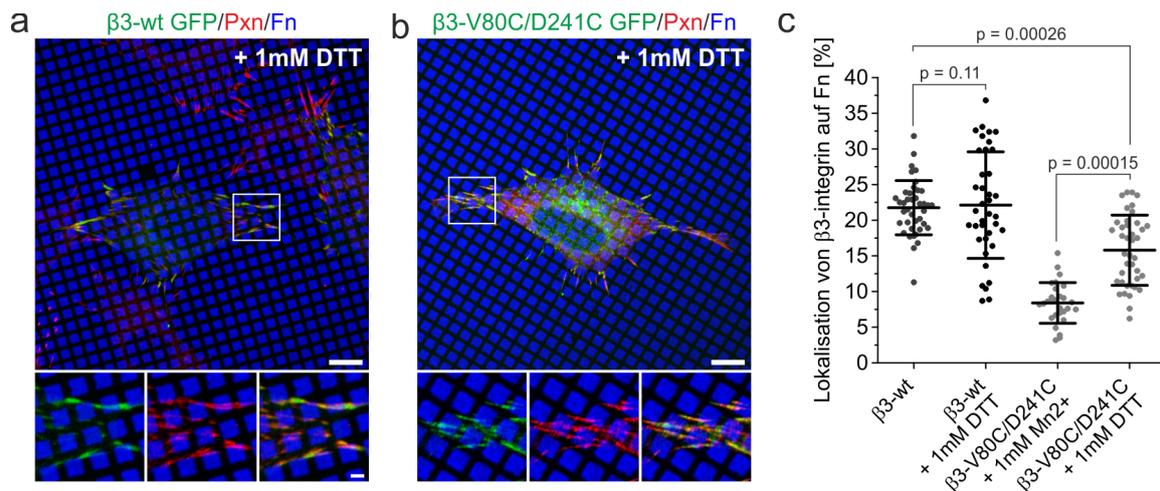


Abbildung 3.18: **Das Aufbrechen von Disulfidbrücken erhöht die Lokalisation von $\beta 3$ -V80C/D241C auf Fn.**

(a) 3T3low Zellen wurden für $\beta 3$ -wt GFP transfiziert und auf Fn/Vn Substraten (Fn in blau) kultiviert. Zellen wurden 20 Minuten vor Fixierung mit 1 mM DTT behandelt. Zusätzlich wurde Paxillin (rot) immunhistochemisch visualisiert. Maßstab: Übersicht 10 μm , Vergrößerungen 2 μm .

(b) $\beta 3$ -V80C/D241C-transfizierte 3T3low Zellen wurden wie in (a) behandelt und auf Fn/Vn Substraten (Fn in blau) kultiviert. (c) Quantifizierung der Kolo-kalisation von $\beta 3$ -Integrin mit Fn. Für einen besseren Vergleich wurde die Kontrolle mit $\beta 3$ -wt Integrin aus Abb. 3.11 und die Kondition mit $\beta 3$ -V80C/D241C + Mn²⁺ (Abb. 3.16) erneut dargestellt. $\beta 3$ -wt Integrin zeigt nach DTT Behandlung keinen Unterschied zur un-behandelten $\beta 3$ -wt Kontrolle. Die Kolo-kalisation mit Fn liegt bei 21.8 %. Im Gegensatz dazu erhöht DTT die Fn-Bindung von $\beta 3$ -V80C/D241C (15.8 % Kolo-kalisation mit Fn). Der Effekt von DTT scheint also spezifisch für $\beta 3$ -V80C/D241C zu sein. $\beta 3$ -wt + 1 mM DTT: N=3, n=38; $\beta 3$ -V80C/D241C + 1 mM DTT: N=3, n=40

4

DISKUSSION

Im Gegensatz zu einigen Integrin Rezeptoren, die sehr selektiv für einen bestimmten Liganden sind (z.B. $\alpha 5 \beta 1$ für Fn) [59, 247], zeigt $\alpha V \beta 3$ -Integrin eine sehr hohe Promiskuität und bindet mindestens 12 verschiedene Liganden [16, 23]. Allerdings gab es schon kurz nach Entdeckung und Beschreibung von $\alpha V \beta 3$ -Integrin kontroverse Daten über dessen Bindungsspezifität. Ursprünglich wurde dieses Integrin aufgrund seiner hohen Affinität für den Liganden Vn als “der Vitronektin Rezeptor“ beschrieben. Interessanterweise konnte in diesen ersten Studien keine Bindung an den Liganden Fn beobachtet werden [31, 32]. Wenig später zeigten Charo und Kollegen, dass Fn und Vn beide mit ähnlicher Affinität gebunden werden. Allerdings konnte eine Fn Bindung effektiv durch Zugabe von Vn als Kompetitor geblockt werden. Daher wurde auch hier eine etwas höhere Affinität von $\alpha V \beta 3$ -Integrin für Vn vermutet [44]. In späteren Arbeiten zeigten zahlreiche Gruppen die Funktion von $\alpha V \beta 3$ -Integrin als Fn-Rezeptor [45–48]. Auch seine Funktion als Opn-, Fbg-, bzw. Tsp-Rezeptor ist mittlerweile gut beschrieben [44, 45, 212–215]. Es gibt aber keine konkrete Aussage ob $\alpha V \beta 3$ -Integrin als promiskuitiver Rezeptor all diese Liganden mit ähnlicher Affinität bindet oder ob einige Liganden präferiert gebunden werden. Dies wird vor allem in einer komplexen ECM interessant, in der je nach Gewebe mehrere Liganden von $\alpha V \beta 3$ -Integrin gleichzeitig und in unmittelbarer Nähe zueinander präsentiert werden [9]. In Anbetracht dieser komplexen ECM gibt es zwei Möglichkeiten die Integrin-Ligand Interaktion zu beschreiben: Entweder $\alpha V \beta 3$ -Integrin bindet seine verschiedenen Liganden nach dem Prinzip “wer zuerst kommt mahlt zuerst“ oder es gibt Regulationsmechanismen, die je nach zellulärer Situation kontrollieren welcher Ligand gebunden wird und welcher nicht. Je nach Szenario könnte man den physiologischen Sinn der hohen Promiskuität von $\alpha V \beta 3$ -Integrin unterschiedlich interpretieren. Ziel dieser Arbeit war es also folgende Fragestellungen zu adressieren:

1. Ist $\alpha V \beta 3$ -Integrin ein ähnlich guter Rezeptor für seine publizierten Liganden Vn, Fn, Opn, Fbg bzw. Tsp oder werden bestimmte Liganden präferiert gebunden?
2. Wie “entscheidet“ $\alpha V \beta 3$ -Integrin zwischen seinen verschiedenen Liganden und welche Regulationsmechanismen gibt es?

Für die Experimente dieser Arbeit wurde eine Subpopulation der NIH 3T3 Zellen - die 3T3low Zellen - verwendet. Diese exprimieren ein sehr geringes Level an endogenem $\beta 3$ -Integrin [216]. Eine Transfektion dieser Zellen mit $\beta 3$ -Integrin GFP führt demnach nicht zu Überexpressionsartefakten. Zudem kann in diesen Zellen der spezifische Effekt einer $\beta 3$ -Integrin Mutante ohne Hintergrund von endogenem $\beta 3$ -Integrin untersucht werden. Die Analyse von $\beta 3$ -Integrin vermittelten Kontakte ist in diesen Zellen außerdem spezifisch für das Heterodimer $\alpha V\beta 3$. Neben der αV -Untereinheit kann die $\beta 3$ -Untereinheit nur noch mit einer weiteren α -Untereinheit ein Heterodimer bilden [16]. Dieses Heterodimer wird $\alpha IIb\beta 3$ -Integrin genannt und wird ausschließlich auf der Zelloberfläche von Thrombozyten exprimiert [248]. Durch Kombination dieser Zelllinie mit homogen beschichteten bzw. differenziellen Zellkultursubstraten sowie hochauflösender Mikroskopie konnte in dieser Arbeit ein elegantes System etabliert werden, um die oben genannten Fragestellungen zu adressieren.

4.1 $\alpha V\beta 3$ -INTEGRIN: “DER VITRONEKTIN REZEPTOR“?

Im ersten Teil dieser Arbeit soll zunächst geklärt werden wie die Adhäsionsbildung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin auf verschiedenen Liganden aussieht und ob einige dieser Liganden präferiert gebunden werden. Die einfachste Weise, um eine Integrin-Ligand Interaktion zu untersuchen ist der Einsatz von homogen beschichteten 2D-Zellkultursubstraten [80, 189, 196]. Auf solchen Substraten zeigt sich aber nur ob eine Adhäsionsbildung auf einem bestimmten Liganden stattfinden kann oder nicht. Ein Vergleich zwischen verschiedenen Liganden ist nur bedingt möglich. Die Daten dieser Arbeit zeigen allerdings deutlich, dass die $\alpha V\beta 3$ -vermittelte Kontaktbildung je nach Ligand variiert. Auf Vn und Opn ist eine sehr gute Rekrutierung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin in periphere Kontakte erkennbar. Das Integrin hat keine Probleme eine Interaktion mit dem Ligand auf der Oberfläche einzugehen. Die hohe Fluoreszenzintensität des GFP-gekoppelten Integrins weist zudem darauf hin, dass auf Vn und Opn die Adhäsionsbildung hauptsächlich über $\alpha V\beta 3$ -Integrin und nicht über andere Integrine stattfindet. Fbg, Fn und Tsp dagegen sind weniger geeignete Liganden. Hier hat $\alpha V\beta 3$ -Integrin Probleme in periphere Kontakte rekrutiert zu werden und zeigt im Vergleich zu den Experimenten auf Vn bzw. Opn ein reduziertes $\beta 3$ -Signal in den Paxillin-positiven Kontakten. Die Adhäsionsbildung findet vermutlich primär über andere Integrine als $\alpha V\beta 3$ -Integrin statt. Es handelt sich also eher um schwaches Co-clustering in einer bereits bestehenden Adhäsion. Im Bereich um den Zellkern und im Zytoplasma zeigt sich stattdessen ein hohes $\beta 3$ -Signal. Dies könnte einerseits bedeuten, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin nach Translation im ER feststeckt und nicht in Kontakte rekrutiert werden kann. Andererseits könnte das Integrin auch in der Plasmamembran in einem inaktiven Stadium quasi “geparkt“ sein bis ein geeigneter Ligand

für eine Adhäsionsbildung zur Verfügung steht. Ein solches "Parken" in einer inaktiven Konformation wurde bereits für andere Integrin-Rezeptoren beschrieben und ist wichtig für eine kontrollierte Bindung extrazellulärer Liganden [16, 249]. Trotz der limitierten Anwendung homogener beschichteter Zellkultursubstrate lässt sich also je nach Ligand eine unterschiedliche Rekrutierung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin in periphere Adhäsionen beobachten. Vn und Opn scheinen geeignete Liganden für $\alpha V\beta 3$ -Integrin zu sein, während dieses Integrin auf Fn, Fbg und Tsp Probleme hat eine Ligandenbindung einzugehen. Dies ist ein erstes Indiz, dass womöglich nicht alle Liganden von $\alpha V\beta 3$ -Integrin mit gleicher Affinität gebunden werden.

4.1.1 EINFLUSS VON SERUMEFFEKTEN

Ein solcher ligandenspezifischer Effekt ist allerdings nur sichtbar wenn ein Zellkulturmedium ohne Zusatz von Serum eingesetzt wird. In Experimenten mit Serum im Medium zeigt sich in allen Konditionen eine vergleichbare Rekrutierung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin. Plötzlich ist also auch auf den Liganden Fbg, Fn und Tsp eine sehr gute Rekrutierung in periphere Adhäsionen möglich und das Integrin wird nicht mehr im ER oder in der Plasmamembran in einem vermutlich inaktiven Stadium für eine Ligandenbindung bereit gehalten. Woran könnte dies aber liegen? In den Experimenten dieser Arbeit wurde in Anwesenheit von Serum eine Überlagerung der spezifisch beschichteten Proteinoberfläche mit bovinem Vn detektiert. Das in der Zellbiologie kommerziell erhältliche FCS enthält einen unspezifischen Mix an Wachstumsfaktoren, Hormonen und Proteinen. Viele Firmen geben die genaue Zusammensetzung nicht an. Jede Charge kann also unterschiedliche Zusammensetzung oder eine unterschiedliche Konzentration von Komponenten enthalten. Es ist aber bekannt, dass im FCS erhebliche Mengen an ECM-Proteinen wie z.B. Fn und Vn vorkommen [229]. Allem Anschein nach können diese Proteine eine beschichtete Proteinoberfläche überlagern. Ob es sich dabei um eine physikalische Überlagerung oder um eine biochemische Interaktion mit dem Protein an der Oberfläche handelt, ist unklar. In dieser Arbeit wurde nur die Überlagerung mit bovinem Vn untersucht. Vermutlich sind analog zum bovinem Vn aber auch noch weitere Serumproteine an der Oberfläche. Durch Einsatz von Serum wird also nicht die spezifische Interaktion eines Integrins mit einem einzelnen Liganden auf der Oberfläche untersucht. Vielmehr ist in jeder Kondition ein unspezifischer ECM-Mix auf der Substratoberfläche. Durch das bovine Vn in diesem ECM-Mix ist damit auf jedem Substrat ein Ligand mit hoher Affinität für $\alpha V\beta 3$ -Integrin vorhanden. Die genaue Vn-Konzentration im FCS ist allerdings nicht bekannt. Im menschlichen Blutplasma beträgt die Vn-Konzentration etwa 200-400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [250, 251]. Dies lässt also vermuten, dass auch im FCS beträchtliche Mengen an Vn vorhanden sind. Bereits ein Bruchteil dieser Konzentration wäre ausreichend,

um ein spezifisch beschichtetes Proteinsubstrat zu “verunreinigen“. Dies macht deutlich, dass ein Arbeiten ohne Serumproteine für diese Art von Assay unbedingt notwendig ist. Möglicherweise sind Serumproteine der Grund warum in bisherigen Studien kein deutlicher Unterschied in der $\alpha V\beta 3$ -vermittelten Adhäsion auf Fn vs. Vn gesehen wurde.

4.1.2 $\alpha V\beta 3$ -INTEGRIN BINDET TROTZ ALLER PROMISKUITÄT BEVORZUGT AN VITRONEKTIN UND OSTEOPONTIN

Auf homogen beschichteten Substraten wurde also ein erstes Indiz deutlich, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin seine Liganden mit womöglich unterschiedlicher Affinität bindet. Wie sieht es aber auf Substraten aus, die zwei Liganden gleichzeitig präsentieren? Mit einem solchen Setup ist man auch der *in vivo* Situation mit einer strukturierten ECM einen Schritt näher. Experimente mit differenziellen Proteinsubstraten unterschiedlicher Kombination zeigen prinzipiell identische Ergebnisse wie homogen beschichtete Proteinsubstrate. Gibt man $\alpha V\beta 3$ -Integrin die Wahlfreiheit zwischen zwei ECM-Liganden wird bevorzugt Vn bzw. Opn gebunden. Die Liganden Fbg, Fn und Tsp werden klar vermieden, wenn sie auf einem Substrat mit Vn bzw. Opn vorliegen. Anhand der differenziellen Lokalisation könnte man im Umkehrschluss auf differenzielle Affinitäten schließen. Damit wären Vn und Opn Liganden mit jeweils hoher Affinität für $\alpha V\beta 3$ -Integrin während Fbg, Fn und Tsp Liganden mit niedriger Affinität sein könnten. Anhand der Lokalisationsstudien lassen sich - wie bereits erwähnt - allerdings nur indirekt differenzielle Affinitäten ableiten. Man kann also nur sagen dass beispielsweise der Ligand Vn im Vergleich zum Ligand Fn mit höherer Affinität gebunden wird. Wie viel höher bzw. niedriger die Affinität ist, lässt sich nicht bestimmen. Für ein umfassendes Affinitätsprofil sind daher biochemische Affinitätsmessungen erforderlich.

4.1.3 BIOCHEMISCHE AFFINITÄTSMESSUNGEN: VITRONEKTIN VS. FIBRONEKTIN

Konkrete Affinitätsmessungen gibt es in der Literatur bisher nur für die Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin an die Liganden Vn und Opn. Die Messungen für Vn zeigen in einem ELISA Assay eine K_D von etwa 12 nM [35]. Für Opn wurde in Anwesenheit von Mg^{2+} eine K_D von 1.3 nM gemessen [175]. Die K_D -Werte beider Liganden befinden sich also in einem ähnlichen nanomolaren Wertebereich. Dies deckt sich mit den Daten auf den differenziellen Proteinsubstraten. Auf Vn/Opn Substraten zeigte sich nahezu eine 50/50 Verteilung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin, was für eine ähnliche Affinität dieses Integrins für beide Proteine spricht (Abb. 3.3). In dieser Arbeit wurden ebenfalls biochemische Affinitätsmessungen für die Bindung

von $\alpha V\beta 3$ -Integrin an Vn mittels BLI erstellt. Affinitätsmessungen mit Opn waren technisch leider nicht möglich. Die Messungen für Vn zeigen keine Dissoziation nach Ligandenbindung weshalb auch keine K_D bestimmt werden konnte (Abb. 3.4). Dies lässt vermuten, dass es sich bei der Interaktion von $\alpha V\beta 3$ -Integrin mit Vn um eine sehr starke Bindung handeln muss. Kontrollen mit Cilengitide als Kompetitor um die Ligandenbindungstasche zeigen, dass diese starke Bindung kein Artefakt ist. Cilengitide ist ein cyclisches RGD-Peptid, das für eine Bindung an $\alpha V\beta 3$ -Integrin optimiert wurde. Dementsprechend besitzt es mit einem IC_{50} -Wert von 0.6 nM eine sehr hohe Affinität für dieses Integrin. Dies bedeutet, dass eine Konzentration von 0.6 nM ausreicht, um 50 % der $\alpha V\beta 3$ -Integrin Population zu inhibieren [252, 253]. Vergleichend liegt der IC_{50} -Wert für den Liganden Vn bei 25 nM [254]. In Anwesenheit von Cilingetide während der Dissoziationsphase konnte eine Dissoziation von Vn "erzwingen" werden. Dies zeigt, dass es sich nicht um ein Messartefakt handelt. Vn kann durch einen Kompetitor mit höherer Affinität für $\alpha V\beta 3$ -Integrin verdrängt werden. Unterstützt werden die Affinitätsmessungen dieser Arbeit durch frühe Daten aus der Literatur. Orlando und Cheresch konnten ebenfalls keine Dissoziation von Vn nach Bindung an $\alpha V\beta 3$ -Integrin beobachten und dementsprechend auch keine Angaben über eine genaue K_D machen. Für diese Experimente wurde die Kinetik der Dissoziation mithilfe des *solid-phase receptor assays* gemessen [34]. Demgegenüber stehen die konkreten K_D -Werte (etwa 12 nM) aus der Arbeit von Chillakuri und Kollegen [35]. Aber wie sind diese unterschiedlichen Daten zu erklären? Zum einen könnte es an der Sensitivität des verwendeten Assays liegen. Persönliche Erfahrungen zeigen, dass das verwendete BLItz-System nicht geeignet ist, um Bindungsstärken im niedrigen, einstelligen nanomolaren Bereich zu analysieren. Möglicherweise kann eine minimale Dissoziation eines Liganden nicht erfasst werden. Zum anderen kann es an den experimentellen Bedingungen liegen. Zweiwertige Kationen haben einen großen Einfluss auf die Affinität eines Integrin-Rezeptors für seinen Liganden. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Ca^{2+} die Affinität von Liganden für seinen Integrin-Rezeptor herabsetzt, während Mn^{2+} die Affinität erhöht [175]. Die Experimente dieser Arbeit wurden in Anwesenheit von 1mM Ca^{2+} und 1mM Mg^{2+} durchgeführt. Dies entspricht physiologischen Konzentrationen [163–165]. In der Arbeit von Chillakuri und Kollegen wurden keine Angaben über die experimentellen Bedingungen gemacht. Es kann also nicht eindeutig nachvollzogen werden warum derartige Abweichungen zustande kommen.

Für den Liganden Fn gibt es keine vergleichbaren Messungen in der Literatur. Cao und Kollegen führten aber Messungen mit einem Fragment von Fn (FnIII₉₋₁₀) durch. Dabei handelt es sich um die Fibronectin TypIII Domäne an Position 9 und 10 mit der RGD-Sequenz. Für die Bindung dieses Fragmentes an $\alpha V\beta 3$ -Integrin wurde eine K_D von 40 nM gemessen [47]. Es handelt sich aber wie gesagt um ein Fn-Fragment und nicht um das vollständige Protein. Demnach werden Faktoren wie z.B. mögliche sterische Interaktionen

der Proteinstruktur mit der Ligandenbindungstasche oder der Effekt von synergistisch wirkenden Bindestellen nicht berücksichtigt. Die BLI-Messungen in dieser Arbeit wurden nicht mit einem Fragment sondern mit dem kompletten Protein durchgeführt. Im Gegensatz zu den Messungen mit Vn war diesmal eine deutliche Dissoziation nach Ligandenbindung erkennbar. Mit einer gemessenen K_D von 54 nM zeigen sich zudem ähnliche Werte wie für das Fn-Fragment in der Arbeit von Cao und Kollegen. Fn ist demnach ein Ligand mit deutlich niedrigerer Affinität für $\alpha V\beta 3$ -Integrin als Vn. Um welchen Faktor sich die Affinität für beide Liganden unterscheidet, kann trotzdem nicht eindeutig bestimmt werden. Da Vn keine Dissoziation nach Ligandenbindung zeigt, könnte ein möglicher K_D -Wert im niedrigen nanomolaren Bereich aber auch genauso gut im picomolaren Bereich liegen.

4.2 FIBRONEKTIN VS. VITRONEKTIN BINDUNG: REGULATION ÜBER MECHANISCHE KRÄFTE ODER SIGNALPROTEINE?

$\alpha V\beta 3$ -Integrin bindet den Liganden Vn also mit wesentlich höherer Affinität als den Liganden Fn. Gemäß dieser *in vitro* Daten ist es nicht erstaunlich, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin auf Fn/Vn Substraten bevorzugt an Vn bindet und eine Adhäsionsbildung auf Fn eher vermeidet. Außerdem lässt sich damit erklären warum initiale Adhäsionen ausschließlich auf Vn entstehen und niemals auf Fn (Abb. 3.5). Nicht erklären lässt sich allerdings warum $\alpha V\beta 3$ -vermittelte Adhäsionen während der Maturierung plötzlich eine Fn-Bindung eingehen können. In der Maturierungsphase muss also etwas passieren, wodurch eine Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin an Fn ermöglicht wird. Dies deutet klar auf eine Art Regulationsmechanismus hin, der kontrolliert welcher Ligand gebunden wird und welcher nicht. Wie könnte ein solcher Mechanismus aber funktionieren? Maturierung von CMAs ist vor allem definiert durch laterale Zusammenlagerung zahlreicher Integrin-Rezeptoren und durch Rekrutierung intrazellulärer Adaptoren [73, 75, 79]. Gleichzeitig wird der Kontakt zum Aktin-Zytoskelett hergestellt und verstärkt [81, 82]. Damit ergeben sich zwei Möglichkeiten, um die plötzliche Fn-Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin in dieser Phase zu erklären:

1. Entweder über die Rekrutierung intrazellulärer Adaptoren/Signalproteine oder...
2. ...über mechanische Kraftübertragung durch die Kopplung der CMAs an das Aktin-Zytoskelett.

Tatsächlich ist es aber äußerst schwierig diese zwei Events zu trennen. Eine Kopplung der CMAs an das Aktin-Zytoskelett während der Maturierung bedeutet gleichzeitig auch Rekrutierung von intrazellulären Adapter-Proteinen. Beide Prozesse finden also zeitgleich statt und sind voneinander abhängig. Im Folgenden werden einige Schlüsselexperimente

dieser Arbeit in Bezug auf beide Überlegungen diskutiert.

4.2.1 MECHANISCHE KRÄFTE MACHEN DEN UNTERSCHIED

Besonders auffällig war vor allem die Art und Weise wie eine Fn-Bindung während der Maturierung stattfindet. Es handelt sich nämlich um eine Translokation von Vn auf Fn, die immer Richtung Zellzentrum ausgerichtet ist (Abb. 3.5 b). Das heißt die Translokation folgt den Kräftevektoren des retrograden Aktin-Flusses, die in centripetaler Richtung wirken [255, 256]. Wenn initiale Adhäsionen an das Aktin-Zytoskelett gekoppelt werden verringert sich der retrograde Aktin-Fluss durch diese Kopplung, aber gleichzeitig wird die Kraftübertragung erhöht [257, 258]. Eine solche inverse Korrelation könnte zu einer lokalen Krafterhöhung führen, die eine Fn-Bindung in centripetaler Richtung ermöglicht. Im Gegensatz dazu ist es eher unwahrscheinlich, dass der retrograde Aktin-Fluss durch seine Dynamik weitere Adapterproteine bereitstellt. Yamashiro und Kollegen schlagen zwar ein Modell vor, in dem der Aktin Fluss vor allem Aktin-bindende Proteine für CMAs bereitstellt [258]. Diese würden laut einer Definition von Kanchanawong und Kollegen aber größtenteils in der Aktin-regulatorischen Schicht von CMAs lokalisieren und sind damit in z-Richtung mindestens 40 nm von der Integrin Signalschicht entfernt [259]. Damit hätten solche Proteine vor allem Funktion in der Kraftübertragung. Die centripetale Translokation $\alpha V\beta 3$ -vermittelter Adhäsionen von Vn auf Fn spricht also in erster Linie für die Hypothese einer kraftabhängigen Fn-Bindung.

Anhand diesem ersten Indiz wurde die Aktin/Myosin-vermittelte Kontraktilität mithilfe von Blebbistatin herabgesetzt. Als zellulärer Effekt wurde eine drastisch reduzierte Fn-Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin beobachtet (Abb. 3.6 a,b). Auf den ersten Blick scheint dies erneut ein klares Indiz für die Hypothese einer kraftabhängigen Fn-Bindung zu sein. Aber was genau passiert bei einer Behandlung von Zellen mit Blebbistatin? Blebbistatin ist ein spezifischer Inhibitor von MyosinII Motorproteinen [260]. Dies führt zu stark verringerter intrazellulärer Kontraktilität und damit zu verringerter Kraftübertragung durch Integrin-vermittelte Adhäsionen [231]. Gleichzeitig führt eine Blebbistatin-Behandlung aber auch zum Abbau maturierter Adhäsionen und stattdessen erhöht sich die Anzahl von wenig maturierten *nascent adhesions* (Abb. 3.6 a) [93, 94]. Diese haben im Vergleich zu maturierten Adhäsionen ein stark verringertes Setup intrazellulärer Adapterproteine [79, 80]. Durch eine Blebbistatin-Behandlung wird also nicht nur die Kraftübertragung verringert, sondern es verringert sich auch die Komplexität des intrazellulären Adapterkomplexes. So klar die Datenlage auf den ersten Blick auch war: Im Endeffekt lässt sich in diesem Experiment nicht genau sagen ob die reduzierte Fn-Bindung durch reduzierte mechanische Kräfte oder durch fehlende Adapter

bzw. Signalproteine zustande kommt.

Wie sieht es also mit weiteren Experimenten aus. Interessanterweise können deNovo induzierte Integrin Cluster nach Mn^{2+} Aktivierung nur auf Vn entstehen aber nicht auf Fn (Abb. 3.7 d; Abb. 3.8). Die Entstehung dieser speziellen Integrin Cluster im Zellzentrum ist nicht spezifisch für Mn^{2+} Behandlung sondern kann generell nach verschiedenen Strategien der Integrin Aktivierung beobachtet werden (z.B. $\beta 3$ -N305T oder $\beta 3$ -VE (erhöhte Affinität für den Aktivator Talin)). Eine besondere Eigenschaft der deNovo induzierten Integrin Cluster ist, dass sie nicht mechanisch an das Aktin-Zytoskelett gekoppelt sind (Abb. 3.7 c). Damit stehen sie vermutlich unter geringer Zugspannung und erfahren möglicherweise ein ähnliches Kraftprofil wie periphere Adhäsionen nach Blebbistatin Behandlung. Auf der anderen Seite wurde auch gut beschrieben, dass solche Cluster nur ein minimales Setup an intrazellulären Adapterproteinen rekrutieren. Bisher wurde nur Talin Bindung beschrieben, weder Paxillin noch FAK noch Vinculin können an diese Art von Adhäsion rekrutiert werden (Abb. 3.7 a,b) [237]. Damit könnte man diese deNovo Mn^{2+} -induzierten Integrin Cluster als Vorläuferkontakte beschreiben, die zwar aktiv sind aber nicht für jeden Liganden aktiv. Erneut kann aber nicht eindeutig geklärt werden warum diese Art von Kontakt nur Vn bindet aber nicht Fn. Anhand der Datenlage sind wieder beide Überlegungen möglich: Entweder es liegt an fehlenden *Inside-out* Signalen intrazellulärer Signalkomponenten oder an fehlender mechanischer Krafteinwirkung.

Wie löst man dieses Problem jetzt also, dass beide Prozesse nicht wirklich getrennt werden können. Strategien wie eine Blebbistatin-Behandlung führen zu einer eher "globalen" Manipulation von zellulärem Verhalten mit vielen Effekten gleichzeitig. Durch genetische *Knockout*-Studien lässt sich in der Regel spezifisch der Effekt eines einzelnen Proteins untersuchen. Daher wurden Vinculin-defiziente Zellen verwendet, um den Effekt eines Vinculin *Knockouts* zu analysieren. Im Prinzip zeigt $\alpha V\beta 3$ -Integrin in dieser Kondition das gleiche Verhalten wie im Blebbistatin-Experiment: Eine drastisch reduzierte Fn-Bindung (Abb. 3.6). Vinculin ist zwar ein intrazelluläres Adapterprotein aber es ist vor allem durch seine Funktion charakterisiert den Kontakt zwischen Integrinen und Aktin zu verstärken [110, 111]. Diesbezüglich wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass ein Vinculin *Knockout* die zelluläre Kraftübertragung auf das unterliegende Substrat stark reduziert [233–235]. Damit hat dieses Protein eine prominente Rolle in der Übertragung von Kräften zwischen der Aktin/Myosin Maschinerie und der Integrin-ECM Achse [230, 261]. Eine *Inside-out* Signalfunktion von Vinculin selbst, die möglicherweise eine Integrin-Ligand Bindung beeinflussen kann, wurde bisher nicht gezeigt. Somit wäre die logische Schlussfolgerung, dass die stark reduzierte Fn-Bindung nach dem genetischen Ausschalten von Vinculin ein Effekt von reduzierter mechanischer Kraftübertragung sein könnte. Trotz dieser logischen Korrelation besteht dennoch die Möglichkeit, dass Vinculin quasi als Adapter fungiert, um weitere Proteine zu

rekrutieren. Durch genetisches Ausschalten von Vinculin wäre damit auch die Rekrutierung von intrazellulären Proteinen beeinflusst. Diese Überlegung ist aber eher unwahrscheinlich: Thievensen und Kollegen zeigten in diesem Zusammenhang nämlich, dass ein Vinculin *Knockout* weiter keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des Adhäsoms hat [262].

Damit festigt sich langsam die Hypothese einer kraftabhängigen Fn-Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin. Bisher wurde allerdings nur beobachtet, dass eine reduzierte mechanische Kraftübertragung zu einer reduzierten Fn-Bindung führt. Um eine allgemeine Gültigkeit einer solchen Hypothese zu belegen, ist es natürlich notwendig zu überprüfen was passiert wenn man zelluläre Kräfte erhöht. Aber wie kann man Kräfte in einem zellulären Kontext erhöhen? Eine Strategie dieser Arbeit war die Überexpression der Myosin-Isoform NMIIA. Diese Isoform ist charakterisiert durch einen schnellen Kraftschlag und es wurde beschrieben, dass sie durch Kontraktion von Aktin-Stressfasern für etwa 60% der zellulären Kraftentwicklung verantwortlich ist [241, 242]. Als zellulärer Effekt nach NMIIA Überexpression zeigt sich auf Fn/Vn Substraten eine signifikant erhöhte Fn-Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin (Abb. 3.9 b,c). Dies lässt in erster Linie vermuten, dass eine Erhöhung zellulärer Kräfte zu einer erhöhten Fn-Bindung führt. Allerdings kann man nicht trivial argumentieren, dass durch NMIIA Überexpression auch verstärkt Myosin Motorproteine in Aktin-Filamente eingebaut werden und dies zu einer gesteigerten Kontraktilität führt. Möglicherweise ist das endogene Level von NMIIA schon ausreichend, um eine annähernde Sättigung der Bindestellen zu erreichen. Dies scheint nach aktuellen Daten von Beach und Kollegen aber nicht der Fall zu sein: Die Autoren vermuten vielmehr, dass die Anzahl der NMIIA Monomere in einem Gleichgewichtszustand zum einen nicht sättigend sondern limitierend ist. Zum anderen führt eine NMIIA Überexpression zu einer erhöhten Bildung kontraktiler Aktin-Filamente entweder durch Abspaltung von einem "Mutterfilament" oder durch deNovo Bildung eines neuen Filaments [263]. Dies sind mögliche Indizien, dass durch NMIIA Überexpression auch tatsächlich die zelluläre Kraftentwicklung erhöht sein könnte. Um aber eine klare Aussage über die Korrelation dieser beiden Prozesse treffen zu können, wären Kraftmessungen einzelner Zellen mittels *traction force microscopy* [264] oder alternativer Methoden nötig.

Nimmt man all diese Experimente zusammen sprechen die Daten klar für die Hypothese einer kraftabhängigen Fn-Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin. Eine Regulation der differentiellen Ligandenbindung über Rekrutierung von Adapterproteinen scheint eher unwahrscheinlich. $\alpha V\beta 3$ -Integrin benötigt also einen mechanischen Stimulus aus dem Zellinneren, um die Bindung an verschiedene Liganden außerhalb der Zelle zu regulieren.

4.3 MECHANISCHE KRÄFTE KONTROLLIEREN DIE KONFORMATION VON α V β 3-INTEGRIN

Nun stellt sich natürlich die interessante Frage wie mechanische Kräfte die Bindungseigenschaften von α V β 3-Integrin beeinflussen. Was passiert mit dem Integrin unter erhöhter Zugspannung, dass plötzlich der Ligand Fn gebunden werden kann? α V β 3-Integrin ist kein statisches Protein. Es unterliegt im Laufe der Integrin Aktivierung und Ligandenbindung zahlreichen Konformationsänderungen [115]. Bisher wurden drei Hauptkonformationen beschrieben: die BC-, die EC- und die EO-Konformation. Schlüsselschritte für den Wechsel zwischen diesen Konformationen ist das Aufrichten der Integrin-Kopfgruppe, die Separierung der α und β -Untereinheit sowie die Auslenkung der Hybrid-Domäne relativ zur β A-Domäne [121, 124, 129]. Mittlerweile ist in der Literatur recht etabliert, dass Aktin/Myosin Kontraktilität den Wechsel von der BC bzw. EC-Konformation in die EO-Konformation beschleunigt. Dies wurde mithilfe von Simulationen für α V β 3-Integrin beschrieben [151–155]. Experimentell konnte dies allerdings nur für ein Leukozyten-spezifisches Integrin - α L β 2 - gezeigt werden [154]. Die Indizien sprechen aber klar dafür, dass erhöhte zelluläre Kontraktilität eine Auslenkung der Hybrid Domäne und damit eine Konformationsänderung von der EC- zur EO-Konformation bewirkt.

4.3.1 α V β 3-INTEGRIN IN DER EC-KONFORMATION: GESCHLOSSEN ABER AKTIV FÜR VITRONEKTIN

Mechanische Kräfte aus dem Zellinneren könnten also die Konformation von α V β 3-Integrin verändern und je nach Konformation könnte dieses Integrin eine unterschiedliche Bindung an die Liganden Fn bzw. Vn zeigen. Um dies zu überprüfen wurden in dieser Arbeit konformationsspezifische Mutationen von α V β 3-Integrin eingesetzt. Das Labor von Bernhard Wehrle Haller (Universität Genf) hat hierfür eine Mutation etabliert, die in der EC-Konformation blockiert ist und nicht mehr in die EO-Konformation wechseln kann. Grundlage sind zwei Punktmutationen (V80C/D241C), die zwischen der Hybrid-Domäne und der β A-Domäne eine Disulfidbrücke einfügen. Diese Disulfidbrücke verhindert schließlich die Auslenkung der Hybrid-Domäne und blockiert das Integrin in der EC-Konformation (Abb. 3.14). Soweit ist zumindest die Theorie für diese Mutationen. In den Zellexperimenten zeigt sich auch ein klarer Effekt. β 3-V80C/D241C kann eine Ligandenbindung eingehen: es wird allerdings ausschließlich Vn gebunden aber nicht Fn (Abb. 3.15, Abb. 3.16). Dieser Effekt korreliert stark mit den Ergebnissen der Blebbistatin bzw. Vinculin-KO Experimente (Abb. 3.5). Anhand dieser Korrelation könnte man vermuten, dass α V β 3-Integrin unter geringer mechanischer

Zugspannung in der EC-Konformation vorliegt. In dieser Konformation ist dieses Integrin ein sehr selektiver Rezeptor für Vn. Ob weitere Liganden wie z.B. Opn - das wie Vn zu den Liganden mit hoher Affinität für $\alpha V\beta 3$ -Integrin zählt - gebunden werden können, muss noch untersucht werden.

Aber kann man eine solche Korrelation ohne Weiteres annehmen oder gibt es mögliche Probleme, die unbedingt beachtet werden müssen? Ein großes Problem ist die neu etablierte $\beta 3$ -V80C/D241C Mutation: Es gibt nämlich keine eindeutigen Beweise, dass diese Mutation auch wirklich durch eine Disulfidbrücke in der EC-Konformation blockiert ist. Es existieren weder elektronenmikroskopische Aufnahmen, noch Kristallstrukturen, die zeigen, dass die Disulfidbrücke zwischen V80C und D241C *in cellula* tatsächlich ausgebildet wird. Daher stellen sich zwei kritische Fragen. Ist diese Disulfidbrücke überhaupt vorhanden und falls ja: ist die Disulfidbrücke stabil genug, um eine Auslenkung der Hybrid-Domäne zu verhindern? In einem ersten Szenario wird zunächst die Frage adressiert wie stabil eine solche Disulfidbrücke in einem zellulären Kontext ist. Bei einer Disulfidbrücke handelt es sich um eine kovalente Bindung zwischen Cysteinresten. Es gibt einige Publikationen, die zeigen, dass Disulfidbrücken durch mechanische Kräfte aufgebrochen werden können [265, 266]. Dies wurde beispielsweise für zwei Adhäsionsmoleküle der CAM-Familie (*cell adhesion molecule*) - Mel-CAM und VCAM - mittels Rasterkraftmikroskopie gezeigt [267, 268]. Zunächst ist also nicht auszuschließen, dass dies auch für $\alpha V\beta 3$ -Integrin möglich ist. Allerdings zeigen Experimente an einzelnen Disulfidbrücken, dass eine Kraft >100 pN erforderlich ist, um eine messbare Reduktion von Disulfidbrücken zu induzieren [266]. Solche Kräfte sind in einem biologischen Kontext als sehr groß einzustufen. Für $\alpha 5\beta 1$ -Integrin wurde beispielsweise beschrieben, dass die Integrin-Ligand Interaktion gemäß einem *catch-bond*-Mechanismus in einem Kraftbereich zwischen 10-30 pN verstärkt wird [126, 269]. Steigen diese Kräfte deutlich an führt dies zu einem "Abreißen" der Integrine vom Substrat. Besteht keine Integrin-Ligand Interaktion mehr, können auch keine Kräfte mehr generiert werden, weil eine Verankerung außerhalb der Zelle fehlt. Die benötigten Kräfte für dieses "Abreißen" variieren vermutlich für verschiedene Integrine und für verschiedene Liganden. Aber dieses Szenario macht es wohl eher unwahrscheinlich, dass ein ausreichender mechanischer Stimulus erzeugt werden kann, um Disulfidbrücken in $\alpha V\beta 3$ -Integrin aufzubrechen. Wird eine solche Disulfidbrücke also wirklich gebildet, ist diese vermutlich sehr stabil und könnte eine Auslenkung der Hybrid-Domäne verhindern.

Das zweite Szenario befasst sich mit der Frage ob eine derartige Disulfidbrücke zwischen V80C und D241C überhaupt ausgebildet wird. Diese Frage ist experimentell schwierig zu adressieren. Die zwei spezifischen Punktmutationen führen zumindest dazu, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin nur noch an Vn binden kann aber nicht mehr an Fn. Dieser Effekt ist an sich ein erstes Indiz, dass eine solche Disulfidbrücke gebildet wird und das Integrin in der

EC-Konformation blockiert. Experimentell könnte man die Existenz einer Disulfidbrücke überprüfen, indem man diese durch entsprechende Reagenzien aufbricht und überprüft ob man den beobachteten Effekt rückgängig machen kann. Hierfür wurde das Reduktionsmittel DTT eingesetzt und nach Behandlung der Zellen konnte in der Tat eine Fn-Bindung auf homogen beschichteten Substraten induziert werden (Abb. 3.17). Auch auf Fn/Vn Substraten zeigte sich eine klar erhöhte Lokalisation auf Fn (von ca. 8 % ohne DTT auf ca. 16% mit DTT). Wildtyplevel wurde allerdings nicht erreicht, was möglicherweise an der eingesetzten Konzentration liegt (Abb. 3.18). Damit kann durch Aufbrechen von Disulfidbrücken wieder annähernd der Wildtypzustand induziert werden. Aber kann man wirklich sagen, dass mit dieser Behandlung spezifisch die Disulfidbrücke zwischen V80C und D241C aufgebrochen wurde? Die Antwort ist schlichtweg "Nein!". Ein großes Problem ist nämlich, dass man mithilfe von DTT nicht spezifisch einzelne Disulfidbrücken aufbrechen kann. Es werden vielmehr alle Disulfidbrücken reduziert, die in Lösung zugänglich sind. Somit hat DTT einen sehr globalen Effekt, da es auf alle Zelloberflächenproteine gleichzeitig wirkt. Integrine selbst besitzen zahlreiche Disulfidbrücken in ihrer Struktur [180–182]. Einige dieser Disulfidbrücken sind in Lösung zugänglich und können durch DTT reduziert werden. Damit gilt DTT als effektiver Aktivator von Integrinen, indem es Konformationsänderungen in der Integrin-Struktur induziert [173, 183–185]. In einem zweiten Szenario könnte DTT aber auch die Struktur der extrazellulären Liganden beeinflussen (in der Literatur noch nicht gezeigt). Damit lässt sich nur schwierig argumentieren, dass der Effekt der DTT Behandlung (erhöhte Fn-Bindung von $\beta 3$ -V80C/D241C Integrin) durch ein spezifisches Aufbrechen der Disulfidbrücke zwischen V80C und D241C zustande kommt. Eine interessante Kontrolle dieser Arbeit zeigt allerdings, dass die verwendete Konzentration von DTT keinen Einfluss auf die Fn-Bindung des Wildtyp Integrins hat. Es scheint also kein genereller Effekt auf alle Integrine oder auf extrazelluläre Liganden zu sein. Vielmehr ist der Effekt spezifisch für die $\beta 3$ -V80C/D241C Mutation. Trotz der globalen Wirkung von DTT könnte man also vermuten, dass der wichtige Schritt für eine erhöhte Fn-Bindung von $\beta 3$ -V80C/D241C das Aufbrechen der Disulfidbrücke zwischen V80C und D241C ist. Das Integrin wäre damit nicht mehr in der EC-Konformation blockiert und könnte durch mechanische Krafteinwirkung wieder aktiviert werden.

Zusammenfassend lässt sich Folgendes vermuten. Die beiden Punktmutationen in $\beta 3$ -V80C/D241C führen tatsächlich zum Ausbilden einer Disulfidbrücke, die das Integrin in der EC-Konformation blockiert. Diese aufgerichtete aber geschlossene Konformation ist typisch für $\alpha V\beta 3$ -Integrine, die unter geringer Zugspannung stehen. Weiter kann in dieser Form ein physiologischer Ligand gebunden werden: dies gilt aber ausschließlich für den Liganden Vn aber nicht für den Liganden Fn. Damit zeigt sich, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin über kraftabhängige Konformationsänderung die Bindung an Fn vs Vn regulieren kann.

4.3.2 $\alpha V\beta 3$ -INTEGRIN IN DER EO-KONFORMATION: DIE GEÖFFNETE KOPFGRUPPE ERMÖGLICHT FIBRONEKTIN BINDUNG

Ein Integrin unter geringer Zugspannung liegt also vermutlich in der EC-Konformation vor und ist sehr selektiv für den Liganden Vn. Kann gemäß der Hypothese dieser Arbeit eine solche Korrelation auch für die EO-Konformation und mechanische Krafteinwirkung gezeigt werden? Bei der $\beta 3$ -N305T Mutation handelt es sich um eine etablierte Integrin Mutante, die schon in einigen Publikationen beschrieben und eingesetzt wurde [132, 237, 245, 270]. Obwohl es auch für diese Mutation keine Kristallstrukturen gibt, wird allgemein angenommen, dass sie durch einen Glykan Keil zwischen der Hybrid-Domäne und der βA -Domäne in der EO-Konformation vorliegt. In dieser Konformation zeigt $\beta 3$ -N305T eine signifikant erhöhte Fn-Bindung im Vergleich zur wt-Kontrolle (27.1 % vs. 16.5%). Eine ähnlich erhöhte Fn-Bindung wird in Experimenten mit erhöhter intrazellulärer Kontraktilität durch NMIIA Überexpression deutlich (von 16.5 % auf 25.1 %). Vergleicht man in diesem Zusammenhang den Input mechanischer Krafteinwirkung (NMIIA Überexpression) mit der Konformation von $\alpha V\beta 3$ -Integrin ($\beta 3$ -N305T) zeigt sich erneut eine eindeutige Korrelation. Man könnte also vermuten, dass ein erhöhter mechanischer Stimulus das Integrin in die maximal aktivierte EO-Konformation bringt. In dieser Konformation kann $\alpha V\beta 3$ -Integrin neben einer Vn-Bindung auch eine stabile Fn-Bindung eingehen. Diese Überlegung deckt sich mit FRAP Daten, die eine stabilere Ligandenbindung der $\beta 3$ -N305T Mutation im Vergleich zu $\beta 3$ -wt zeigen [237].

Auch für diese Korrelation müssen mögliche Probleme kritisch hinterfragt werden. Die Daten dieser Arbeit lassen nämlich vermuten, dass der Glykan Keil alleine das Integrin vermutlich nicht in die maximal aktivierte Konformation bringen kann. Reduziert man intrazelluläre Kontraktilität, ist $\beta 3$ -N305T fast ausschließlich auf Vn lokalisiert und kann nicht mehr effektiv an Fn binden (Abb. 3.11). Damit zeigt sich für die $\beta 3$ -N305T Mutation unter Blebbistatin-Bedingungen der gleiche Effekt wie für $\beta 3$ -wt. Diese experimentellen Daten werden unterstützt durch MD Simulation von Vasyl Mykuliak (Universität Tampere, Finnland). Ohne zusätzliche Krafteinwirkung kann die Glykosylierung an Position N303 keine maximale Auslenkung der Hybrid-Domäne induzieren (Vergleich mit komplett aktivierten Kristallstrukturen von $\alpha IIb\beta 3$ -Integrin; Abb. 3.12) [129, 153]. Vielmehr ist der Auslenkungswinkel nicht unterschiedlich zum Wildtyp Integrin. Allerdings ist die Auslenkung stabiler und die Hybrid Domäne kann aufgrund sterischer Interaktion mit dem Glykan Keil vermutlich nicht mehr in die geschlossene Konformation wechseln. Ohne mechanische Krafteinwirkung zeigt sich also kaum ein Unterschied zwischen $\beta 3$ -wt und $\beta 3$ -N305T: Weder für die extrazelluläre Ligandenbindung (beide scheinen nur an Vn zu binden) noch für die Konformation. Wie kommt aber die erhöhte Fn-Bindung von $\beta 3$ -N305T im Vergleich zu $\beta 3$ -wt zustande wenn die

intrazelluläre Kontraktilität nicht durch Blebbistatin herabgesetzt ist? Es könnte sein, dass die Glykosylierung in $\beta 3$ -N305T das Integrin in einer Art voraktiviertem Zustand stabilisiert. Ein solcher Zustand könnte als *extended-primed* bezeichnet werden [130, 131]. Das Integrin befindet sich in einem aufgerichteten, teilweise aktiven Zustand aber die Hybrid-Domäne ist nicht maximal ausgelenkt. Der Glykan Keil blockiert zudem eine Konformationsänderung zurück in die EC bzw. BC-Konformation. Diese Voraktivierung und auch die Stabilisierung in der voraktivierten Form könnte die Energiebarriere herabsetzen, die notwendig ist für den Wechsel in die maximal aktivierte EO-Konformation. Der mechanische Stimulus, um $\beta 3$ -N305T in die EO-Konformation zu bringen könnte also geringer sein als für $\beta 3$ -wt. Dies ist ein möglicher Grund warum unter identischen experimentellen Bedingungen nur für $\beta 3$ -N305T eine erhöhte Fn-Bindung beobachtet wurde obwohl der Glykan Keil alleine vermutlich nicht ausreichend ist, um das Integrin in die EO-Konformation zu bringen. Eine erhöhte Fn-Bindung ist für $\beta 3$ -wt nur zu erreichen, wenn die intrazelluläre Kontraktilität durch z.B. NMIIA Überexpression erhöht wird. Trotz dieser Probleme zeigt sich nach wie vor eine Gültigkeit der oben beschriebenen Korrelation. $\alpha V\beta 3$ -Integrin unter erhöhter intrazellulärer Zugspannung liegt vermutlich in der EO-Konformation vor und kann in diesem Zustand sowohl an Vn als auch an Fn binden.

4.4 STRUKTUR-FUNKTION-BEZIEHUNG VON $\alpha V\beta 3$ -INTEGRIN: AKTIV BEDEUTET NICHT GLEICH AKTIV FÜR JEDEN LIGANDEN

Anhand der Daten dieser Arbeit kann für $\alpha V\beta 3$ -Integrin eine Struktur-Funktion-Beziehung abgeleitet werden. Es wird nämlich seit Langem kontrovers diskutiert welche Konformation von Integrinen die aktive Konformation ist. Unter "aktiv" ist in diesem Zusammenhang die Fähigkeit gemeint einen Liganden zu binden. Bis heute ist eher die Meinung vertreten, dass nur die EO-Konformation eine stabile Ligandenbindung eingehen kann [129, 134]. Durch eine maximale Auslenkung der Hybrid-Domäne wird in der EO-Konformation je nach Integrin Rezeptor eine 1000-6000fach erhöhte Affinität für extrazelluläre Liganden erreicht [134–136]. Für $\alpha 5\beta 1$ -Integrin erhöht sich die Affinität für Liganden bei einem Wechsel von der EC- in die EO-Konformation sogar um das 4000-6000fache [136]. Die sehr starken Affinitätsunterschiede zwischen diesen beiden Konformationen machen es eher unwahrscheinlich, dass ein Integrin in der EC-Konformation eine stabile Ligandenbindung eingehen kann. Aber kann man diese Überlegung auf alle Integrine übertragen? Es gibt nämlich Daten von Gruppen, die für einige Integrine eine Ligandenbindung bereits in der BC- bzw. EC-Konformation zeigen [123, 166, 271]. Darunter befindet sich auch $\alpha V\beta 3$ -Integrin: in Kristallstrukturanalysen konnte dieses Integrin in der EC-Konformation an ein RGD-Peptid binden [166]. Ob eine

solche Bindung aber in einer physiologischen Situation stattfinden kann oder ob es sich nur um eine Art "eingefrorenes Standbild" handelt, war bisher unklar. Die Daten dieser Arbeit zeigen für $\alpha V\beta 3$ -Integrin zum ersten Mal experimentell und *in cellula*, dass eine Bindung physiologischer Liganden bereits in der EC-Konformation möglich ist. Allerdings wird in dieser Konformation nicht jeder Ligand gebunden. "Aktiv" für einen Liganden - in diesem Fall Vn - bedeutet also nicht gleich "aktiv" für weitere mögliche Liganden - in diesem Fall Fn. Ein solches Szenario wurde bereits von Boettiger und Kollegen vermutet [140]. Bisher fehlte es aber an experimentellen Beweisen. Das hoch promiskuitive $\alpha V\beta 3$ -Integrin ist in der EC-Konformation also ein sehr selektiver Rezeptor für den Liganden Vn, während die Promiskuität stark reduziert ist. Wechselt $\alpha V\beta 3$ -Integrin durch mechanische Krafteinwirkung aber von der EC- in die EO-Konformation kann der sehr selektive Vn-Rezeptor in einen promiskuitiven Fn/Vn Rezeptor überführt (Abb. 4.1). Ein ähnliches Verhalten wurde vor Kurzem auch für $\alpha 4\beta 7$ -Integrin beschrieben. Je nach Konformation bindet es seine Liganden MAdCAM-1 und VCAM-1 mit unterschiedlicher Affinität [272]. Ob eine Ligandenbindung in der EC-Konformation für weitere Integrine möglich ist bleibt nach wie vor unklar. Möglicherweise handelt es sich um ein spezifisches Verhalten für wenige Integrin-Rezeptoren. Interessant ist eine solche Überlegung vor allem für Integrin-Rezeptoren, die eine vergleichsweise geringe Affinitätserhöhung während der Aktivierung zeigen. Für $\alpha IIb\beta 3$ -Integrin wurde beispielsweise nach dem Wechsel von der EC- in die EO-Konformation "nur" eine 200fach erhöhte Affinität für ein RGD-Peptid beschrieben [129]. Möglicherweise kann dies auf weitere $\beta 3$ -enthaltende Integrine wie z.B. $\alpha V\beta 3$ -Integrin übertragen werden. Demgegenüber steht eine mindestens 4000fach erhöhte Affinität für $\alpha 5\beta 1$ -Integrin [136]. Es könnte also Folgendes der Fall sein: je geringer die Affinitätsunterschiede nach einem Wechsel von der EC- in die EO-Konformation sind, desto wahrscheinlicher könnte eine stabile Bindung extrazellulärer Liganden in der EC-Konformation sein.

Zusammengefasst kann $\alpha V\beta 3$ -Integrin durch kraftinduzierte Konformationsänderung von einem sehr selektiven Vn Rezeptor in einen promiskuitiveren Rezeptor überführt werden. Am Beispiel der Liganden Fn und Vn zeigt sich also eine komplexe Struktur-Funktion Beziehung. Demnach gibt es nicht "die eine" Konformation, die $\alpha V\beta 3$ -Integrin kompetent für eine Ligandenbindung macht. Auch werden Liganden nicht nach dem Prinzip "wer zuerst kommt, mahlt zuerst" gebunden. Stattdessen wird je nach Konformation reguliert, welcher Ligand gebunden wird und welcher nicht. Ob dieses Modell auf andere Liganden von $\alpha V\beta 3$ -Integrin wie z.B. Opn - als Ligand mit hoher Affinität - oder Fbg - als Ligand mit niedriger Affinität - anwendbar ist, muss durch weitere Studien geklärt werden.

4.5 DIE KONSERVIERTE RGD-SEQUENZ: EIN ERKENNUNGSMOTIV ABER UNTERSCHIEDLICHE BINDUNGS-AFFINITÄTEN

Alle getesteten Liganden dieser Arbeit werden von $\alpha V\beta 3$ -Integrin über die gleiche Signalsequenz - die RGD Sequenz - gebunden [212, 215, 273, 274]. Interessanterweise gibt es trotz gleicher Erkennungssequenz unterschiedliche Bindungsaffinitäten für diese Liganden. Es ist bereits bekannt, dass die 3D Struktur der RGD-Sequenz einen großen Einfluss auf die Affinität für einen Integrin-Rezeptor hat [50, 52]. Sowohl Konformation als auch Flexibilität der Struktur sind vermutlich wichtig für die Bindung des Liganden an das entsprechende Integrin. Auch flankierende Aminosäuren und die Anzahl der Disulfidbrücken in der Struktur des Liganden beeinflussen die Affinität der Integrin-Ligand Interaktion [53–55, 274]. Dies folgt ganz dem Prinzip: Je besser der “Schlüssel“ (= der extrazelluläre Ligand) in das “Schloss“ (= die Integrin Ligandenbindungstasche) passt, desto stärker die Bindung. Ein ähnliches Prinzip wird auch in der Arbeit von Cormier und Kollegen deutlich. Sie schlagen vor, dass die Ligandenbindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin nicht nur von der Affinität sondern auch von der Zugänglichkeit der Ligandenbindungstasche abhängt [275]. Was bedeutet dies aber für $\alpha V\beta 3$ -Integrin und die Fn vs. Vn Situation. Einige RGD-Liganden wie z.B. Fn präsentieren ihre RGD-Sequenz in einem ausgelagerten Loop [276, 277]. Im Fall von Fn wird die RGD-Sequenz in einem recht kurzen, unflexiblen Loop präsentiert. Dies könnte zu sterischen Interaktionen mit der restlichen Proteinstruktur führen und eine Fn-Bindung nur bedingt ermöglichen. Unterstützt wird diese Überlegung durch MD Simulationen von Vasyly Mykuliak (Universität Tampere, Finnland). Für ein Fn-gebundenes $\alpha V\beta 3$ -Integrin in der EC-Konformation wurden tatsächlich sterische Interaktionen mit der Fn-Struktur beobachtet (unpublizierte Daten). Für den Liganden Vn sind bisher noch keine Kristallstrukturen publiziert, daher kann über die Konformation der RGD-Sequenz keine Aussage getroffen werden. Man könnte aber die Hypothese aufstellen, dass die RGD-Sequenz des Liganden Vn im Gegensatz zu Fn in einem langen und womöglich flexibleren Loop präsentiert wird. Durch eine solche Flexibilität könnte die RGD-Sequenz ohne sterische Interaktion mit der restlichen Proteinstruktur gebunden werden. Diese Überlegung könnte erklären warum $\alpha V\beta 3$ -Integrin den Liganden Vn mit hoher Affinität bindet während der Ligand Fn trotz gleicher Erkennungssequenz mit vergleichsweise niedrigerer Affinität gebunden wird. Die Abhängigkeit der Ligandenbindung von der Proteinstruktur auf extrazellulärer Seite würde aber nur erklären warum $\alpha V\beta 3$ -Integrin den Liganden Vn mit vergleichsweise höherer Affinität bindet als Fn. Man könnte dies als intrinsische Affinität eines Integrins für seinen Liganden bezeichnen. In einer Art *default*-Zustand ohne dynamische Veränderung auf Integrin-Ebene entscheidet die 3D-Konformation des Liganden über die Bindungsstärke an das Integrin. Die Daten dieser Arbeit zeigen aber klar, dass die Fn vs. Vn Bindung

von $\alpha V\beta 3$ -Integrin dynamisch ist und einer nicht-linearen Regulation durch mechanische Krafteinwirkung folgt. Laut der aktuellen Hypothese liegt die Ursache in einer kraftabhängigen Konformationsänderung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin. Wechselt dieses Integrin von der EC-Konformation in die EO-Konformation ändert sich auch die Koordination von Metallionenbindestellen und vermutlich auch die Konformation der Ligandenbindungstasche [20, 131, 278, 279]. Demnach könnte die Zugänglichkeit der Ligandenbindungstasche für extrazelluläre Liganden je nach Konformation von $\alpha V\beta 3$ -Integrin variieren. In der EC-Konformation mit geschlossener Kopfgruppe ($\beta 3$ -V80C/D241C) könnte auch die Ligandenbindungstasche in einer Art geschlossenen Konformation sein. Was bedeutet dies aber für die Fn vs. Vn Bindung? Die Daten dieser Arbeit zeigen nämlich, dass in dieser Konformation ausschließlich Vn gebunden werden kann. Angenommen Vn präsentiert seine RGD-Sequenz wirklich in einem langen, flexiblen Loop, dann könnte diese Flexibilität trotz geschlossener Ligandenbindungstasche eine Bindung ohne sterische Interaktionen ermöglichen (Abb. 4.1 a). Im Gegensatz dazu könnte der kurze, recht unflexible RGD-Loop des Liganden Fn nicht zugänglich für die Ligandenbindungstasche sein. Eine Bindung der Sequenz in dieser Konformation wäre demnach ohne sterische Interaktion mit der restlichen Proteinstruktur nicht möglich. Findet durch mechanische Krafteinwirkung schließlich eine Aktivierung von der EC-Konformation in die EO-Konformation ($\beta 3$ -N305T + mechanische Kraft) statt, verändert sich vermutlich auch die Konformation der Ligandenbindungstasche in eine Art geöffnete Konformation. In dieser Konformation kann nach wie vor Vn gebunden werden und höchstwahrscheinlich ist die Zugänglichkeit für diesen Liganden erhöht im Vergleich zur EC-Konformation. Der stärkere Effekt zeigt sich aber in Bezug auf die Fn-Bindung. In der geöffneten Form scheinen die sterischen Interaktionen stark verringert zu sein und die RGD-Sequenz kann trotz der unflexiblen Konformation stabil gebunden werden (Abb. 4.1 c). Vn bleibt aber durch die bessere Zugänglichkeit nach wie vor der klar bevorzugte Ligand. In einem Aktivierungszustand zwischen diesen beiden Konformationen (EP-Konformation) ist $\alpha V\beta 3$ -Integrin vermutlich nicht maximal aktiviert [132]. Dementsprechend könnte sich auch die Ligandenbindungstasche in einer intermediären Konformation befinden. In einem solchen Zustand kann der Ligand Fn zwar gebunden werden, aber vermutlich führt eine Bindung immer noch zu sterischen Interaktionen und damit zu keiner stabilen Fn-Bindung (Abb. 4.1 b).

Dieses Modell ist aufgrund der fehlenden Kristallstruktur von Vn recht spekulativ, würde aber plausibel die nicht-lineare Regulation der Fn vs. Vn Bindung durch kraftabhängige Konformationsänderung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin erklären. Oder anders ausgedrückt: warum ein sehr selektiver Vn-Rezeptor durch kraftabhängige Konformationsänderung plötzlich zu einem promiskuitiven Fn/Vn Rezeptor wird.

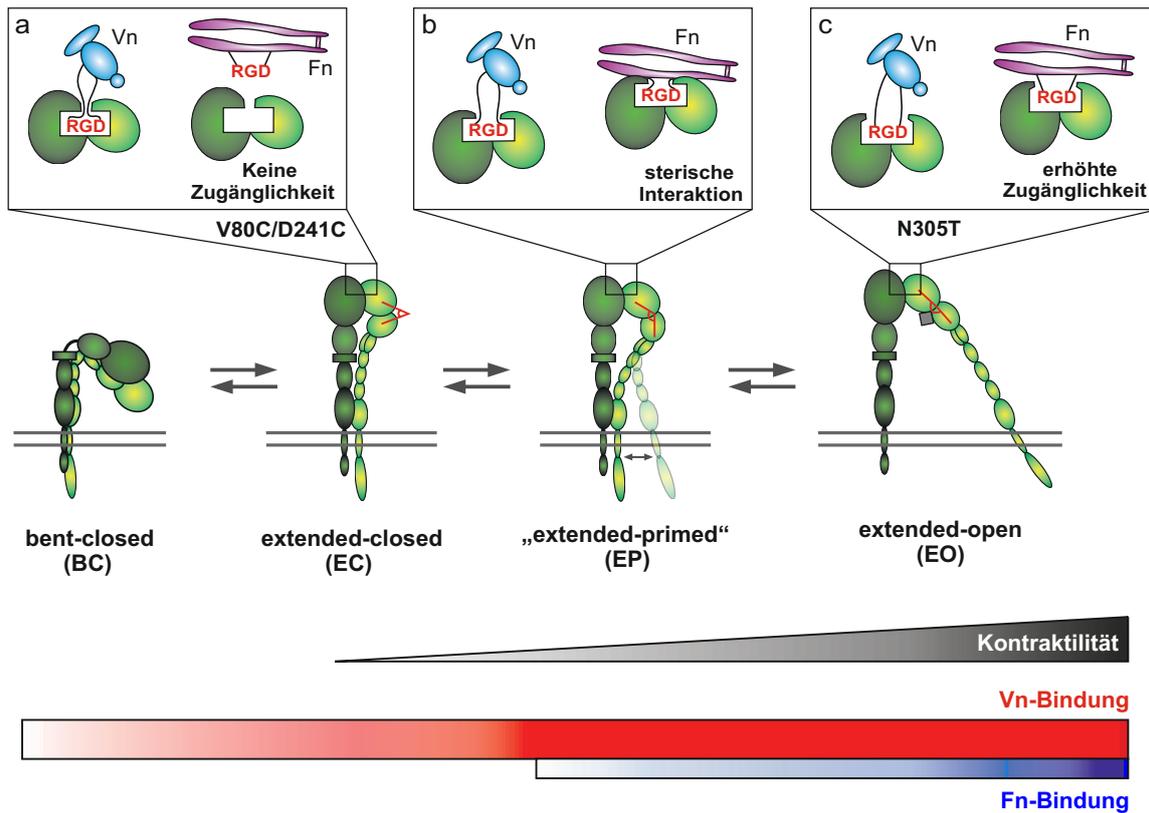


Abbildung 4.1: **Hypothetisches Model der differentiellen Ligandenbindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin.**

Die Konformation von $\alpha V\beta 3$ -Integrin wird durch mechanische Kräfteinwirkung kontrolliert. Ein Integrin unter geringer Zugspannung befindet sich in der EC-Konformation, während ein Integrin unter hoher Zugspannung durch eine Auslenkung der Hybrid-Domäne in die maximal aktivierte EO-Konformation wechselt. Zwischen diesen beiden Zuständen gibt es vermutlich noch intermediäre Konformationen, bei denen die Hybrid Domäne nicht maximal ausgelenkt wird (EP-Konformation). Die Auslenkungswinkel der Hybrid-Domäne sind beispielhaft mit roten Winkelsymbolen dargestellt. Je nach Konformation variieren auch die Ligandenbindungseigenschaften von $\alpha V\beta 3$ -Integrin. In der EC-Konformation wird ausschließlich Vn gebunden aber nicht Fn. Wechselt das Integrin über die EP-Konformation in die EO-Konformation wird dieser sehr selektive Rezeptor in einen promiskuitiven Rezeptor überführt: Die Fähigkeit Fn zu binden nimmt graduell zu, allerdings bleibt Vn der klar bevorzugte Ligand. Ein möglicher Grund für diese konformationsabhängigen Ligandenbindung könnte an der Zugänglichkeit der Ligandenbindungstasche liegen. (a) In der EC-Konformation könnte auch die Ligandenbindungstasche in einer Art geschlossenen Konformation vorliegen und in diesem Zustand nur zugänglich für die RGD-Sequenz von Vn aber nicht für die von Fn sein. (c) Wechselt das Integrin in die EO-Konformation könnte dies auch eine Konformationsänderung der Ligandenbindungstasche in eine geöffnete Konformation induzieren. In diesem Zustand könnte die Zugänglichkeit für Fn erhöht sein, wodurch eine stabile Fn-Bindung ohne sterische Interaktionen mit der restlichen Proteinstruktur ermöglicht wird. (b) Die EP-Konformation zwischen diesen beiden Extremzuständen könnte demnach eine intermediäre Konformation der Ligandenbindungstasche induzieren. In einer solchen Konformation kann die RGD-Sequenz von Fn zwar gebunden werden aber vermutlich kommt es immer noch zu sterischen Interaktionen mit der restlichen Proteinstruktur. Eine stabile Fn-Bindung ist in diesem Zustand nur bedingt möglich.

4.6 ZELLULÄRE KONSEQUENZEN EINER KRAFTABHÄNGIGEN LIGANDENBINDUNG

Über mechanische Kraft und über die Integrin Konformation kann also reguliert werden welcher Ligand in welcher zellulären Situation gebunden wird. Ein solcher Regulationsmechanismus lässt stark vermuten, dass eine Bindung an unterschiedliche Liganden auch unterschiedliche biologische Konsequenzen für eine Zelle bewirkt. Schon lange gibt es Vermutungen, dass die Bindung eines bestimmten Liganden auf extrazellulärer Seite eine spezifische intrazelluläre Signalkaskade einleitet. Nur wenige Studien konnten aber experimentelle Beweise liefern. Böttiger und Kollegen zeigen in diesem Zusammenhang, dass die Phosphorylierung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin und Adaptoren auf intrazellulärer Seite nach Bindung an Fn vs. Vn variiert [140]. Auch die Interaktion mit weiteren Zelloberflächenrezeptoren kann durch Bindung an verschiedene Liganden variieren. Soldi und Kollegen zeigten beispielsweise, dass der Rezeptor *Crosstalk* zwischen der $\beta 3$ -Integrin Untereinheit und dem Rezeptor des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors 2 (VEGFR-2) erhöht war, wenn Zellen auf dem Liganden Vn kultiviert wurden. Auf Fn war keine Erhöhung des Rezeptor *Crosstalk* zu beobachten [280]. Dies sind aber nur Indizien, dass die Bindung verschiedener Liganden ein unterschiedliches Signalmodul in Zellen aktivieren kann. Ein eindeutiger Mechanismus mit zugehörigem zellulärem Effekt wurde bis heute nicht gezeigt. Eine solche Überlegung würde aber plausibel die hohe Promiskuität einiger Integrin-Rezeptoren erklären. Demnach könnte ein einzelnes Integrin je nach Art der Ligandenbindung ein unterschiedliches zelluläres Verhalten auslösen. Dies wird vor allem interessant, da $\alpha V\beta 3$ -Integrin in beispielsweise Krebszellen oder angiogenen Endothelzellen hoch reguliert ist [281–285]. Die Eigenschaft der Promiskuität von $\alpha V\beta 3$ -Integrin könnte also an den invasiven Charakter von Krebszellen geknüpft sein.

4.6.1 BINDUNG LÖSLICHER LIGANDEN VS. IMMOBILISIRTER LIGANDEN

Ob eine Bindung verschiedener Liganden also unterschiedliche Signale in der Zelle bewirkt, kann im Moment nicht geklärt werden. Allerdings lassen sich durch die kraftabhängige Regulation der differentiellen Ligandenbindung einige Phänomene aus der Literatur erklären. Huvoneers und Kollegen zeigen beispielsweise, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin kein lösliches Fn binden kann [43]. Dies war insofern überraschend, da die Bindung dieses Integrins an immobilisiertes Fn recht etabliert war [45–47]. Wie kann man diesen Unterschied für die Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin an lösliches vs. immobilisiertes Fn erklären? Bei einer Integrin-Ligand Interaktion mit einem löslichen Liganden fehlt die Kopplung an ein Substrat oder ECM-Netzwerk außerhalb

der Zelle. Das Integrin ist zwar mit dem Aktin-Zytoskelett auf intrazellulärer Seite verbunden aber es kann nur bedingt Kraft erzeugt werden, weil ein "Gegenhalten" von außen fehlt. Die logische Schlussfolgerung wäre, dass eine solche Bindung unter geringer mechanischer Krafteinwirkung stattfindet. Laut der Hypothese dieser Arbeit würden Integrine, die lösliche Liganden binden, somit in der EC-Konformation vorliegen. Der mechanische Stimulus für einen Wechsel in die EO-Konformation fehlt. In dieser Arbeit wurde klar gezeigt, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin in der EC-Konformation nur an Vn bindet aber nicht an Fn. Damit wäre auch erklärt warum Huveneers und Kollegen keine Bindung an lösliches Fn beobachten konnten. Alternativ könnte man vermuten, dass die RGD-Sequenz von Fn in der löslichen, kompakten Konformation kryptisch verborgen ist und damit nicht für eine Bindung zur Verfügung steht. Wird Fn in ein ECM-Netzwerk eingebaut könnte die RGD-Sequenz durch die Remodellierung freigesetzt werden. Dies scheint aber eher unwahrscheinlich, da $\alpha 5\beta 1$ -Integrin (Hauptrezeptor für Fn) sehr wohl in der Lage ist lösliches Fn zu binden [43]. Die RGD-Sequenz muss also prinzipiell auch in der kompakten, löslichen Form zugänglich sein aber anscheinend nur für $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und nicht für $\alpha V\beta 3$ -Integrin. Interessanterweise konnte in der Studie von Huveneers und Kollegen auch für die $\beta 3$ -N305T Mutation keine Bindung an lösliches Fn erfasst werden [43]. Diese Beobachtung bestätigt die Hypothese dieser Arbeit, dass der Glykan Keil in $\beta 3$ -N305T vermutlich nicht ausreichend ist für eine maximale Aktivierung. Ohne mechanische Krafteinwirkung befindet sich das Integrin also trotz erhöhter Aktivierung nicht in einer geeigneten Konformation, die eine stabile Fn-Bindung erlaubt.

Ob $\alpha V\beta 3$ -Integrin weitere publizierte Liganden in ihrer löslichen Form binden kann ist wenig untersucht. Für eine Bindung an lösliches Vn gibt es noch keine Daten. Geissinger und Kollegen publizierten allerdings Indizien, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin in Melanozyten an lösliches Opn bindet und dadurch ein Überlebenssignal für Zellen generiert wird [286]. Anhand der Daten dieser Arbeit wurde Opn - wie auch Vn - als Ligand mit hoher Affinität für $\alpha V\beta 3$ -Integrin eingestuft. Dementsprechend könnte auch eine Bindung von $\alpha V\beta 3$ -Integrin an lösliches Vn ohne Probleme möglich sein.

4.6.2 MECHANISCHE KRAFT UND FIBRILLÄRE ADHÄSIONEN

$\alpha 5\beta 1$ -Integrin und $\alpha V\beta 3$ -Integrin sind im Integrin-Feld beides etablierte Fn-Rezeptoren [41, 42, 45, 46]. Interessanterweise zeigen beide Integrine eine unterschiedliche Lokalisation in Fibroblasten [287]. $\alpha V\beta 3$ -Integrin ist hauptsächlich in peripheren CMAs lokalisiert und bildet den Kern dieser Art von Adhäsion. $\alpha 5\beta 1$ -Integrin ist von dem Kern peripherer CMAs ausgeschlossen und befindet sich stattdessen teilweise in einer Art "Gürtel" um diese Kernregion [288]. Vor allem ist $\alpha 5\beta 1$ -Integrin aber in zentralen Bereichen der Zelle in sogenannten

fibrillären Adhäsionen lokalisiert, in denen $\alpha V\beta 3$ -Integrin wiederum nicht vorkommt [289]. Eine solche Lokalisation zeigte sich auch in Experimenten dieser Arbeit. Werden Zellen auf homogen beschichtetem Fn kultiviert ist $\alpha V\beta 3$ -Integrin ausschließlich in peripheren Adhäsionen lokalisiert und abwesend von fibrillären, zentralen Adhäsionen (nicht gezeigt). Was hat diese unterschiedliche Lokalisation aber jetzt mit der Hypothese einer kraftabhängigen Ligandenbindung dieser Arbeit zu tun? Fibrilläre Adhäsionen sind hauptsächlich an dünne Aktin-Filamenten gekoppelt und nicht an Aktin-Stressfasern [289, 290]. Daher werden sie als Adhäsionen bezeichnet, die unter geringer Zugspannung stehen. Außerdem werden sie im Gegensatz zu peripheren Adhäsionen nicht abgebaut, wenn intrazelluläre Kontraktilität reduziert wird [93, 94, 287, 290]. Im Gegensatz dazu sind die klassischen Fokalkontakte in der Zellperipherie an dicke Aktin-Stressfasern gekoppelt und zeigen erhöhte Adhäsionskraft [289, 291, 292]. Es handelt sich bei diesen zwei Arten von Adhäsionen also um Strukturen mit vollkommen unterschiedlichem Kraftprofil. Die Hypothese dieser Arbeit besagt, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin für Fn-Bindung einen ausreichend mechanischen Stimulus erfahren muss. In peripheren Fokalkontakten reicht dieser Stimulus anscheinend aus, um eine Fn-Bindung zu induzieren. In fibrillären Adhäsionen ist der mechanische Input vermutlich nicht groß genug und $\alpha V\beta 3$ -Integrin wird möglicherweise aufgrund fehlender Kräfte aus dieser Art von Adhäsion ausgeschlossen. Daten von Michael Bachmann zeigen zudem, dass eine solche Restriktion in periphere Adhäsionen für die $\beta 3$ -N305T Mutation nicht stattfindet (ca. 32% Lokalisation zu zentralen Adhäsionen). Dies zeigt, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin prinzipiell in fibrilläre Adhäsionen rekrutiert werden kann. Die nötige Konformationsänderung in eine mehr geöffnete Konformation findet aber vermutlich aufgrund fehlender mechanischer Kräfte nicht statt. Bei der $\beta 3$ -N305T Mutation handelt es sich zwar selbst nicht um eine maximal aktivierte Integrin-Variante aber der reduzierte mechanische Stimulus in fibrillären Adhäsionen scheint trotzdem ausreichend zu sein, um eine Fn-Bindung zu gewährleisten. Dies spricht wiederum für die Überlegung, dass der Glykan Keil einen stabilisierenden Effekt hat und dadurch die Energiebarriere für einen Wechsel in die EO-Konformation herabsetzt (s. Kap. 4.5.2). Fokalkontakte in der Zellperipherie und zentrale, fibrilläre Adhäsionen entstehen allerdings nicht unabhängig voneinander. Vielmehr entwickeln sich fibrilläre Adhäsionen im Verlauf des Reifungsprozesses aus den peripheren Adhäsionen, werden zentral verlagert und ändern ihre Zusammensetzung intrazellulärer Proteine [287]. Wie verringert sich während der Reifung aber das Kraftprofil und wie funktioniert der Wechsel von $\alpha V\beta 3$ -Integrin zu $\alpha 5\beta 1$ -Integrin? Kürzlich wurde dem Protein Kank eine interessante Rolle in diesem Prozess zugeschrieben. Kank bindet an Talin und blockiert dadurch eine Aktin-Bindestelle. Als Resultat werden geringere Kräfte entlang der Talin-Integrin Achse übertragen und auch die Integrin-Ligand Interaktion wird dadurch geschwächt [288, 293]. Aufgrund der reduzierten Kräfte werden langlebige *Catch-bonds* in kurzlebige *Slip-bonds* verwandelt. Dies könnte

den Übergang von $\alpha V\beta 3$ -Fn Bindungen (hoher mechanischer Zug) zu $\alpha 5\beta 1$ -Fn Bindungen (niedriger mechanischer Zug) einleiten [45, 46].

5

FAZIT UND OFFENE FRAGEN

Die Daten dieser Arbeit zeigen interessante neue Erkenntnisse über die Promiskuität von $\alpha V\beta 3$ -Integrin. In Situationen mit geringer zellulärer Kontraktilität befindet sich $\alpha V\beta 3$ -Integrin in der EC-Konformation und ist - wie ursprünglich beschrieben [31, 32] - “der Vn-Rezeptor“. Erhöht sich die intrazelluläre Kontraktilität und damit der laterale Zug auf das Integrin wechselt $\alpha V\beta 3$ -Integrin über intermediäre Konformationen in die EO-Konformation. Dieser Prozess erhöht die Promiskuität und es kann zusätzlich der Ligand Fn gebunden werden (Abb. 4.1). Damit wäre auch plausibel erklärt warum $\alpha V\beta 3$ -Integrin in zahlreichen Studien eine Funktion als Fn-Rezeptor in Kultur und *in vivo* zugeschrieben wurde [45–48]. Diese Arbeit beschreibt somit zum ersten Mal experimentell einen Mechanismus über den $\alpha V\beta 3$ -Integrin regulieren kann welcher Ligand gebunden wird und welcher nicht. In einer komplexen ECM findet demnach keine Bindung nach dem Prinzip “wer zuerst kommt mahlt zuerst“ statt. Ob ein solcher Regulationsmechanismus auch für weitere Integrin-Rezeptoren gültig ist oder exklusiv für $\alpha V\beta 3$ -Integrin ist, muss in weiteren Studien geklärt werden. Erste Experimente zeigen, dass mechanische Kräfte auch für die Ligandenbindung von $\alpha V\beta 5$ -Integrin eine Rolle spielen könnten (unpublizierte Daten Michael Bachmann). Was bedeutet ein solcher Mechanismus aber in Bezug auf den physiologischen Sinn der Promiskuität? Ohne Regulationsmechanismus würde die hohe Promiskuität gewährleisten, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin die meiste Zeit an einen Ligand gebunden ist wodurch eine konstante Signalübertragung ins Zellinnere erreicht wird. In einem solchen Szenario wäre allein die Aufrechterhaltung des Signales wichtig und dieses Signal könnte unabhängig vom Liganden immer gleich sein. Die Tatsache, dass ein Regulationsmechanismus existiert macht es viel wahrscheinlicher, dass unterschiedliche Liganden auch unterschiedliche Signale in die Zelle weiterleiten. Es wäre also interessant in weiteren Studien zu überprüfen ob eine Bindung an verschiedene Liganden tatsächlich ein unterschiedliches Signalmodul in Zellen aktiviert.

ABBKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADMIDAS	... Adjacent to MIDAS
BC	... Bent-closed Konformation
BLI	... Biolayer Interferometrie
bVn	... bovines Vitronektin
CAM	... Cell adhesion molecule
CMA	... Zell-Matrix Adhäsion
d μ CP	... direct microcontact printing
DMSO	... Dimethylsulfoxid
DTT	... Dithiothreitol
EC	... Extended-closed Konformation
ECM	... Extrazelluläre Matrix
EO	... Extended-open Konformation
EP	... Extended-primed Konformation
FACS	... Fluorescence assisted cell sorting
FAK	... Fokale Adhäsions Kinase
FCS	... Fetales Kälberserum
Fn	... Fibronektin
Fbg	... Fibrinogen
GFP	... green fluorescent protein
K _D	... Dissoziationsgleichgewichtskonstante
MDS	... Molekulardynamik Simulationen
MEF	... embryonale Mausfibroblasten
MIDAS	... Metal ion dependent adhesion site
MOC	... Mander's overlap coefficient
NMIIA	... nicht-muskuläres Myosin IIA
Opn	... Osteopontin
PDB	... Proteindatenbank
PDMS	... Polydimethyl-Siloxan
Pxn	... Paxillin
RGD	... Arginin-Glycin-Asparaginsäure
rhVn	... rekombinantes humanes Vitronektin
SIM	... Structured Illumination Microscopy
SyMBS	... Synergistic metal ion binding site
Tln	... Talin
Tsp	... Thrombospondin
Vcl	... Vinculin
VEGFR	... Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor
Vn	... Vitronektin
WF	... Weitefeld
Wt	... Wildtyp

PUBLIKATIONEN UND KONFERENZBEITRÄGE

PUBLIKATIONEN IN . . .

. . . wissenschaftlichen Magazinen:

- R. Rahikainen*, M. von Essen*, M. Schäfer, L. Qi, T. Ihalainen, B. Wehrle-Haller, M. Bastmeyer, C. Huang and V. Hytönen “Mechanical stability of talin rod controls cell migration and substrate sensing”, *Scientific reports* **7**, 3571 (2017)
*gleichberechtigte Erstautoren
- M. Bachmann*, M. Schäfer*, V. Mykuliak, M. Ripamonti, L. Heiser, K. Weissenbruch, S. Krübel, C. Franz, V. Hytönen, B. Wehrle-Haller and M. Bastmeyer “Ligand binding of $\alpha V\beta 3$ integrin is enlarged in response to mechanical force”, bioRxiv (doi.org/10.1101/200493)
*gleichberechtigte Erstautoren

POSTERBEITRÄGE . . .

. . . bei Konferenzen/Tagungen:

- M. Schäfer, M. Bachmann, M. Bastmeyer “Fibronectin vs. vitronectin sensing of $\alpha V\beta 3$ integrin”
Workshop, Forschungszentrum Jülich (2016)
- M. Schäfer, M. Bachmann, M. Bastmeyer “Mechanical forces regulate ligand binding promiscuity of $\alpha V\beta 3$ integrin”
Mechanical forces in cell biology, EMBL Heidelberg (2017)
Ausgezeichnet mit dem Posterpreis

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bastmeyer bedanken, der mir diese Arbeit am Zoologischen Institut ermöglichte. Sie haben mir stets Vertrauen geschenkt und mich eigenständig arbeiten lassen. Gleichzeitig habe ich immer auf Ihre Unterstützung und auf gute Ratschläge bauen können. Vielen Dank für die schöne und lehrreiche Zeit am Institut.

Herrn Prof. Dr. Wehrle-Haller danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur. „Berni“, war aber vielmehr als „nur“, ein Zweitkorrektor. Er hat durch Bereitstellung von Reagenzien wie z.B. den Integrin-Mutationen einen entscheidenden Beitrag an dieser Arbeit geleistet. Durch zahlreiche Diskussionen in E-Mails oder bei persönlichen Besuchen hat er immer gute Impulse und Ideen für neue Experimente geliefert. Vielen Dank dafür.

Dr. Michael Bachmann danke ich für die gute Zusammenarbeit auf dem Feld der Integrine, für aufschlussreiche Diskussionen und für stundenlanges „Integrin-Fachgesimpel“.

Vasyl Mykuliak danke ich für die Bereitstellung struktureller Analysen und für MDS-Daten.

Ich möchte mich auch bei allen meinen Kollegen für die schöne und lustige Zeit am Institut bedanken. Durch Diskussionen und gute Ratschläge konnten wissenschaftliche Probleme oftmals schnell gelöst werden.

Ein besonderer Dank gilt Kai Weißenbruch, Sarah Bertels und Marc Hippler: bei solchen Kollegen freut man sich morgens auf die Arbeit. Ihr habt stets ein offenes Ohr gehabt und mir in meiner Doktorandenzeit immer geholfen, wenn es Probleme gab. Oftmals wurden wissenschaftliche Probleme auch noch abends bei einem guten Burger oder auf dem Squash Court diskutiert.

Ich danke meiner Masterstudentin Lia Heiser für ihre sehr gute Arbeit im Labor und für die Bereitstellung von Daten für diese Arbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe Bastmeyer danke ich für eine wirklich schöne Zeit und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern, bei meiner Schwester Vera und bei meiner Freundin Yvonne für den stetigen Rückhalt und ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht bedanken. Vielen Dank für die moralische und finanzielle Stütze, die schönen, abwechslungsreichen Stunden und tolle kulinarische Verköstigungen.

LITERATUR

- [1] J. C. Adams und F. M. Watt. „Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix“. In: *Development* 117.4 (1993), S. 1183–1198.
- [2] C. Frantz, K. M. Stewart und V. M. Weaver. „The extracellular matrix at a glance“. In: *J Cell Sci* 123.24 (2010), S. 4195–4200.
- [3] R. O. Hynes. „The extracellular matrix: not just pretty fibrils“. In: *Science* 326.5957 (2009), S. 1216–1219.
- [4] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli und N. K. Karamanos. „Extracellular matrix structure“. In: *Advanced drug delivery reviews* 97 (2016), S. 4–27.
- [5] S. F. Badylak. „The extracellular matrix as a biologic scaffold material“. In: *Biomaterials* 28.25 (2007), S. 3587–3593.
- [6] A. Jabłońska-Trypuć, M. Matejczyk und S. Rosochacki. „Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs“. In: *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 31.sup1 (2016), S. 177–183.
- [7] M. W. Pickup, J. K. Mouw und V. M. Weaver. „The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer“. In: *EMBO reports* 15.12 (2014), S. 1243–1253.
- [8] P. Lu, V. M. Weaver und Z. Werb. „The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression“. In: *J Cell Biol* 196.4 (2012), S. 395–406.
- [9] R. O. Hynes und A. Naba. „Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions“. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.1 (2012), a004903.
- [10] M. K. Gordon und R. A. Hahn. „Collagens“. In: *Cell and tissue research* 339.1 (2010), S. 247.
- [11] P. D. Yurchenco und G. Ruben. „Type IV collagen lateral associations in the EHS tumor matrix. Comparison with amniotic and in vitro networks.“ In: *The American journal of pathology* 132.2 (1988), S. 278.
- [12] R. V. Iozzo. *Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function*. 1998.
- [13] R. V. Iozzo und L. Schaefer. „Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans“. In: *Matrix Biology* 42 (2015), S. 11–55.
- [14] C. Bonnans, J. Chou und Z. Werb. „Remodelling the extracellular matrix in development and disease“. In: *Nature reviews Molecular cell biology* 15.12 (2014), S. 786.
- [15] A. Teti. „Regulation of cellular functions by extracellular matrix.“ In: *Journal of the American Society of Nephrology* 2.10 (1992), S83.
- [16] R. O. Hynes. „Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines“. In: *Cell* 110.6 (2002), S. 673–687.
- [17] Y. Takada, X. Ye und S. Simon. „The integrins“. In: *Genome biology* 8.5 (2007), S. 215.

- [18] J. W. Tamkun, D. W. DeSimone, D. Fonda, R. S. Patel, C. Buck, A. F. Horwitz und R. O. Hynes. „Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin“. In: *Cell* 46.2 (1986), S. 271–282.
- [19] M. Barczyk, S. Carracedo und D. Gullberg. „Integrins“. In: *Cell and tissue research* 339.1 (2010), S. 269–280.
- [20] I. D. Campbell und M. J. Humphries. „Integrin structure, activation, and interactions“. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.3 (2011), a004994.
- [21] R. O. Hynes. „Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion“. In: *Cell* 69.1 (1992), S. 11–25.
- [22] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus und J. W. Smith. „Ligand binding to integrins“. In: *Journal of Biological Chemistry* 275.29 (2000), S. 21785–21788.
- [23] J. D. Humphries, A. Byron und M. J. Humphries. „Integrin ligands at a glance“. In: *Journal of cell science* 119.19 (2006), S. 3901–3903.
- [24] A. Sonnenberg. „Integrins and their ligands“. In: *Adhesion in Leukocyte Homing and Differentiation*. Springer, 1993, S. 7–35.
- [25] E. Ruoslahti. „RGD and other recognition sequences for integrins“. In: *Annual review of cell and developmental biology* 12.1 (1996), S. 697–715.
- [26] E. Ruoslahti und M. D. Pierschbacher. „New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins“. In: *Science* 238.4826 (1987), S. 491–497.
- [27] M. Izumi, K. M. Yamada und M. Hayashi. „Vitronectin exists in two structurally and functionally distinct forms in human plasma“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 990.2 (1989), S. 101–108.
- [28] I. Schwartz, D. Seger und S. Shaltiel. „Vitronectin“. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 31.5 (1999), S. 539–544.
- [29] J. Reilly und J. Nash. „Vitronectin (serum spreading factor): its localisation in normal and fibrotic tissue.“ In: *Journal of clinical pathology* 41.12 (1988), S. 1269–1272.
- [30] S. El-Amin, H. Lu, Y. Khan, J. Burems, J. Mitchell, R. Tuan und C. Laurencin. „Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering“. In: *Biomaterials* 24.7 (2003), S. 1213–1221.
- [31] R. Pytela, M. D. Pierschbacher und E. Ruoslahti. „A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82.17 (1985), S. 5766–5770.
- [32] R. Pytela, M. D. Pierschbacher, M. H. Ginsberg, E. F. Plow und E. Ruoslahti. „Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptors“. In: *Science* 231.4745 (1986), S. 1559–1562.
- [33] H. Bisswanger. *Enzyme kinetics: principles and methods*. John Wiley & Sons, 2017.
- [34] R. A. Orlando und D. A. Cheresh. „Arginine-glycine-aspartic acid binding leading to molecular stabilization between integrin alpha v beta 3 and its ligand.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 266.29 (1991), S. 19543–19550.
- [35] C. R. Chillakuri, C. Jones und H. J. Mardon. „Heparin binding domain in vitronectin is required for oligomerization and thus enhances integrin mediated cell adhesion and spreading“. In: *FEBS letters* 584.15 (2010), S. 3287–3291.

- [36] T. G. Kapp, F. Rechenmacher, S. Neubauer, O. V. Maltsev, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Zarka, U. Reuning, J. Notni, H.-J. Wester, C. Mas-Moruno u. a. „A comprehensive evaluation of the activity and selectivity profile of ligands for RGD-binding integrins“. In: *Scientific reports* 7 (2017), S. 39805.
- [37] H. Ma, P. Hao, L. Zhang, C. Ma, P. Yan, R. Wang und C. Zhang. „A new cyclic RGD peptide dimer for integrin $\alpha v \beta 3$ imaging“. In: *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 20.4 (2016), S. 613–619.
- [38] L. Zardi, C. Cecconi, O. Barbieri, B. Carnemolla, M. Picca und L. Santi. „Concentration of fibronectin in plasma of tumor-bearing mice and synthesis by Ehrlich ascites tumor cells“. In: *Cancer research* 39.9 (1979), S. 3774–3779.
- [39] Y. Mao und J. E. Schwarzbauer. „Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process“. In: *Matrix biology* 24.6 (2005), S. 389–399.
- [40] R. Pankov und K. M. Yamada. „Fibronectin at a glance“. In: *Journal of cell science* 115.20 (2002), S. 3861–3863.
- [41] C. Wu, J. Bauer, R. Juliano und J. McDonald. „The alpha 5 beta 1 integrin fibronectin receptor, but not the alpha 5 cytoplasmic domain, functions in an early and essential step in fibronectin matrix assembly.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 268.29 (1993), S. 21883–21888.
- [42] K. Wennerberg, L. Lohikangas, D. Gullberg, M. Pfaff, S. Johansson und R. Fässler. „Beta 1 integrin-dependent and-independent polymerization of fibronectin.“ In: *The Journal of Cell Biology* 132.1 (1996), S. 227–238.
- [43] S. Huveneers, H. Truong, R. Fässler, A. Sonnenberg und E. H. Danen. „Binding of soluble fibronectin to integrin $\alpha 5 \beta 1$ —link to focal adhesion redistribution and contractile shape“. In: *Journal of cell science* 121.15 (2008), S. 2452–2462.
- [44] I. F. Charo, L. Nannizzi, J. W. Smith und D. A. Cheresh. „The vitronectin receptor alpha v beta 3 binds fibronectin and acts in concert with alpha 5 beta 1 in promoting cellular attachment and spreading on fibronectin.“ In: *The Journal of cell biology* 111.6 (1990), S. 2795–2800.
- [45] P. Roca-Cusachs, N. C. Gauthier, A. del Rio und M. P. Sheetz. „Clustering of $\alpha 5 \beta 1$ integrins determines adhesion strength whereas $\alpha v \beta 3$ and talin enable mechanotransduction“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.38 (2009), S. 16245–16250.
- [46] H. B. Schiller, M.-R. Hermann, J. Polleux, T. Vignaud, S. Zanivan, C. C. Friedel, Z. Sun, A. Raducanu, K.-E. Gottschalk, M. Théry u. a. „ β 1-and α v-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments“. In: *Nature cell biology* 15.6 (2013), S. 625.
- [47] L. Cao, J. Nicosia, J. Larouche, Y. Zhang, H. Bachman, A. C. Brown, L. Holmgren und T. H. Barker. „Detection of an integrin-binding mechanoswitch within fibronectin during tissue formation and fibrosis“. In: *ACS nano* 11.7 (2017), S. 7110–7117.
- [48] E. H. Danen, P. Sonneveld, C. Brakebusch, R. Fässler und A. Sonnenberg. „The fibronectin-binding integrins $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha v \beta 3$ differentially modulate RhoA–GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis“. In: *The Journal of cell biology* 159.6 (2002), S. 1071–1086.
- [49] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher u. a. „Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal“. In: *Cell* 44.4 (1986), S. 517–518.

- [50] C. Mas-Moruno, F. Rechenmacher und H. Kessler. „Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate. Design, synthesis and clinical evaluation“. In: *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 10.10 (2010), S. 753–768.
- [51] M. D. Pierschbacher und E. Ruoslahti. „Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 262.36 (1987), S. 17294–17298.
- [52] R. Haubner, D. Finsinger und H. Kessler. „Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha v\beta 3$ integrin for a new cancer therapy“. In: *Angewandte Chemie International Edition in English* 36.13-14 (1997), S. 1374–1389.
- [53] J. J. Calvete, W. Schaefer, T. Soszka, W. Lu, J. Cook, B. A. Jameson und S. Niewiarowski. „Identification of the disulfide bond pattern in albolabrin, an RGD-containing peptide from the venom of *trimeresurus albolabris*: Significance for the express of platelet aggregation inhibitory activity“. In: *Biochemistry* 30.21 (1991), S. 5225–5229.
- [54] M. Nieberler, U. Reuning, F. Reichart, J. Notni, H.-J. Wester, M. Schwaiger, M. Weinmüller, A. Räder, K. Steiger und H. Kessler. „Exploring the role of RGD-recognizing integrins in cancer“. In: *Cancers* 9.9 (2017), S. 116.
- [55] M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley und R. Timpl. „Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides“. In: *European Journal of Biochemistry* 210.3 (1992), S. 911–921.
- [56] S. Liu. „Radiolabeled multimeric cyclic RGD peptides as integrin $\alpha v\beta 3$ targeted radiotracers for tumor imaging“. In: *Molecular pharmaceutics* 3.5 (2006), S. 472–487.
- [57] S.-i. Aota, T. Nagai und K. Yamada. „Characterization of regions of fibronectin besides the arginine-glycine-aspartic acid sequence required for adhesive function of the cell-binding domain using site-directed mutagenesis.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 266.24 (1991), S. 15938–15943.
- [58] E. H. Danen, S.-i. Aota, A. A. van Kraats, K. M. Yamada, D. J. Ruiter und G. N. van Muijen. „Requirement for the synergy site for cell adhesion to fibronectin depends on the activation state of integrin $\alpha 5\beta 1$ “. In: *Journal of Biological Chemistry* 270.37 (1995), S. 21612–21618.
- [59] S.-i. Aota, M. Nomizu und K. M. Yamada. „The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 269.40 (1994), S. 24756–24761.
- [60] S. D. Redick, D. L. Settles, G. Briscoe und H. P. Erickson. „Defining fibronectin’s cell adhesion synergy site by site-directed mutagenesis“. In: *The Journal of cell biology* 149.2 (2000), S. 521–527.
- [61] R. D. Bowditch, M. Hariharan, E. F. Tominna, J. W. Smith, K. M. Yamada, E. D. Getzoff und M. H. Ginsberg. „Identification of a novel integrin binding site in fibronectin. Differential utilization by beta 3 integrins.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 269.14 (1994), S. 10856–10863.
- [62] Y. Mao und J. E. Schwarzbauer. „Accessibility to the Fibronectin Synergy Site in a 3D Matrix Regulates Engagement of $\alpha 5\beta 1$ versus $\alpha v\beta 3$ Integrin Receptors“. In: *Cell communication & adhesion* 13.5-6 (2006), S. 267–277.

-
- [63] D. S. Harburger und D. A. Calderwood. „Integrin signalling at a glance“. In: *Journal of cell science* 122.2 (2009), S. 159–163.
- [64] R. Zaidel-Bar, S. Itzkovitz, A. Ma’ayan, R. Iyengar und B. Geiger. „Functional atlas of the integrin adhesome“. In: *Nature cell biology* 9.8 (2007), S. 858–867.
- [65] E. R. Horton, J. D. Humphries, J. James, M. C. Jones, J. A. Askari und M. J. Humphries. „The integrin adhesome network at a glance“. In: *J Cell Sci* 129.22 (2016), S. 4159–4163.
- [66] J. Qin, O. Vinogradova und E. F. Plow. „Integrin bidirectional signaling: a molecular view“. In: *PLoS biology* 2.6 (2004), e169.
- [67] J. E. Schwarzbauer. „Cell migration: may the force be with you“. In: *Current Biology* 7.5 (1997), R292–R294.
- [68] M. P. Sheetz, D. P. Felsenfeld und C. G. Galbraith. „Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes“. In: *Trends in cell biology* 8.2 (1998), S. 51–54.
- [69] J. D. Humphrey, E. R. Dufresne und M. A. Schwartz. „Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis“. In: *Nature reviews Molecular cell biology* 15.12 (2014), S. 802.
- [70] K. H. Nakayama, L. Hou und N. F. Huang. „Role of extracellular matrix signaling cues in modulating cell fate commitment for cardiovascular tissue engineering“. In: *Advanced healthcare materials* 3.5 (2014), S. 628–641.
- [71] P. Moreno-Layseca und C. H. Streuli. „Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression“. In: *Matrix Biology* 34 (2014), S. 144–153.
- [72] M. Vicente-Manzanares, C. K. Choi und A. R. Horwitz. „Integrins in cell migration—the actin connection“. In: *Journal of cell science* 122.2 (2009), S. 199–206.
- [73] M. L. Gardel, I. C. Schneider, Y. Aratyn-Schaus und C. M. Waterman. „Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration“. In: *Annual review of cell and developmental biology* 26 (2010), S. 315.
- [74] R. Changede, X. Xu, F. Margadant und M. P. Sheetz. „Nascent integrin adhesions form on all matrix rigidities after integrin activation“. In: *Developmental cell* 35.5 (2015), S. 614–621.
- [75] C. K. Choi, M. Vicente-Manzanares, J. Zareno, L. A. Whitmore, A. Mogilner und A. R. Horwitz. „Actin and α -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner“. In: *Nature cell biology* 10.9 (2008), S. 1039–1050.
- [76] K. K. Elineni und N. D. Gallant. „Regulation of cell adhesion strength by peripheral focal adhesion distribution“. In: *Biophysical journal* 101.12 (2011), S. 2903–2911.
- [77] S. Tojkander, G. Gateva und P. Lappalainen. „Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles“. In: *J Cell Sci* 125.8 (2012), S. 1855–1864.
- [78] A. Livne und B. Geiger. „The inner workings of stress fibers— from contractile machinery to focal adhesions and back“. In: *J Cell Sci* 129.7 (2016), S. 1293–1304.
- [79] R. Zaidel-Bar, M. Cohen, L. Addadi und B. Geiger. „Hierarchical assembly of cell–matrix adhesion complexes“. In: *Biochemical Society Transactions* 32.3 (2004), S. 416–420.

- [80] E. Zamir und B. Geiger. „Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions“. In: *Journal of cell science* 114.20 (2001), S. 3583–3590.
- [81] C. Ciobanasi, B. Faivre und C. Le Clainche. „Actomyosin-dependent formation of the mechanosensitive talin–vinculin complex reinforces actin anchoring“. In: *Nature communications* 5 (2014), S. 3095.
- [82] D. W. Dumbauld, H. Shin, N. D. Gallant, K. E. Michael, H. Radhakrishna und A. J. Garcia. „Contractility modulates cell adhesion strengthening through focal adhesion kinase and assembly of vinculin-containing focal adhesions“. In: *Journal of cellular physiology* 223.3 (2010), S. 746–756.
- [83] K. R. Legate und R. Fässler. „Mechanisms that regulate adaptor binding to β -integrin cytoplasmic tails“. In: *Journal of cell science* 122.2 (2009), S. 187–198.
- [84] S. Etienne-Manneville und A. Hall. „Rho GTPases in cell biology“. In: *Nature* 420.6916 (2002), S. 629–635.
- [85] M. Vicente-Manzanares, D. J. Webb und A. R. Horwitz. „Cell migration at a glance“. In: *Journal of cell science* 118.21 (2005), S. 4917–4919.
- [86] C. De Pascalis und S. Etienne-Manneville. „Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions“. In: *Molecular Biology of the Cell* 28.14 (2017), S. 1833–1846.
- [87] B. Short. *Stress fibers guide focal adhesions to maturity*. 2012.
- [88] P. W. Oakes, Y. Beckham, J. Stricker und M. L. Gardel. „Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template“. In: *J Cell Biol* 196.3 (2012), S. 363–374.
- [89] N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi u. a. „Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates“. In: *Nature cell biology* 3.5 (2001), S. 466.
- [90] H. Wolfenson, A. Bershadsky, Y. I. Henis und B. Geiger. „Actomyosin-generated tension controls the molecular kinetics of focal adhesions“. In: *J Cell Sci* 124.9 (2011), S. 1425–1432.
- [91] M. Vicente-Manzanares, M. A. Koach, L. Whitmore, M. L. Lamers und A. F. Horwitz. „Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells“. In: *The Journal of cell biology* 183.3 (2008), S. 543–554.
- [92] D. Riveline, E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger und A. D. Bershadsky. „Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDial-dependent and ROCK-independent mechanism“. In: *The Journal of cell biology* 153.6 (2001), S. 1175–1186.
- [93] J. T. Parsons, A. R. Horwitz und M. A. Schwartz. „Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension“. In: *Nature reviews Molecular cell biology* 11.9 (2010), S. 633–643.
- [94] K. Burridge und C. Guilly. „Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension“. In: *Experimental cell research* 343.1 (2016), S. 14–20.
- [95] J. P. Califano und C. A. Reinhart-King. „Substrate stiffness and cell area predict cellular traction stresses in single cells and cells in contact“. In: *Cellular and molecular bioengineering* 3.1 (2010), S. 68–75.

-
- [96] M. Ghibaudo, A. Saez, L. Trichet, A. Xayaphoummine, J. Browaeys, P. Silberzan, A. Buguin und B. Ladoux. „Traction forces and rigidity sensing regulate cell functions“. In: *Soft Matter* 4.9 (2008), S. 1836–1843.
- [97] M. Prager-Khoutorsky, A. Lichtenstein, R. Krishnan, K. Rajendran, A. Mayo, Z. Kam, B. Geiger und A. D. Bershadsky. „Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing“. In: *Nature cell biology* 13.12 (2011), S. 1457.
- [98] S. J. Franco, M. A. Rodgers, B. J. Perrin, J. Han, D. A. Bennin, D. R. Critchley und A. Huttenlocher. „Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics“. In: *Nature cell biology* 6.10 (2004), S. 977–983.
- [99] S. J. Franco und A. Huttenlocher. „Regulating cell migration: calpains make the cut“. In: *Journal of cell science* 118.17 (2005), S. 3829–3838.
- [100] C. M. Kenific, S. J. Stehbens, J. Goldsmith, A. M. Leidal, N. Faure, J. Ye, T. Wittmann und J. Debnath. „NBR1 enables autophagy-dependent focal adhesion turnover“. In: *J Cell Biol* 212.5 (2016), S. 577–590.
- [101] M. N. Sharifi, E. E. Mowers, L. E. Drake, C. Collier, H. Chen, M. Zamora, S. Mui und K. F. Macleod. „Autophagy promotes focal adhesion disassembly and cell motility of metastatic tumor cells through the direct interaction of paxillin with LC3“. In: *Cell reports* 15.8 (2016), S. 1660–1672.
- [102] E. J. Ezratty, M. A. Partridge und G. G. Gundersen. „Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase“. In: *Nature cell biology* 7.6 (2005), S. 581.
- [103] I. Kaverina, O. Krylyshkina und J. V. Small. „Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation“. In: *The Journal of cell biology* 146.5 (1999), S. 1033–1044.
- [104] V. Vogel und M. Sheetz. „Local force and geometry sensing regulate cell functions“. In: *Nature reviews Molecular cell biology* 7.4 (2006), S. 265.
- [105] P. W. Oakes und M. L. Gardel. „Stressing the limits of focal adhesion mechanosensitivity“. In: *Current opinion in cell biology* 30 (2014), S. 68–73.
- [106] B. D. Hoffman, C. Grashoff und M. A. Schwartz. „Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction“. In: *Nature* 475.7356 (2011), S. 316.
- [107] M. Yao, B. T. Goult, B. Klapholz, X. Hu, C. P. Toseland, Y. Guo, P. Cong, M. P. Sheetz und J. Yan. „The mechanical response of talin“. In: *Nature communications* 7 (2016), S. 11966.
- [108] A. W. M. Haining, M. von Essen, S. J. Attwood, V. P. Hytönen und A. del Rio Hernández. „All subdomains of the talin rod are mechanically vulnerable and may contribute to cellular mechanosensing“. In: *ACS nano* 10.7 (2016), S. 6648–6658.
- [109] P. Atherton, B. Stutchbury, D. Jethwa und C. Ballestrem. „Mechanosensitive components of integrin adhesions: role of vinculin“. In: *Experimental cell research* 343.1 (2016), S. 21–27.
- [110] V. P. Hytönen und V. Vogel. „How force might activate talin’s vinculin binding sites: SMD reveals a structural mechanism“. In: *PLoS computational biology* 4.2 (2008), e24.

- [111] A. del Rio, R. Perez-Jimenez, R. Liu, P. Roca-Cusachs, J. M. Fernandez und M. P. Sheetz. „Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding“. In: *Science* 323.5914 (2009), S. 638–641.
- [112] B. T. Goult, J. Yan und M. A. Schwartz. „Talin as a mechanosensitive signaling hub“. In: *J Cell Biol* 217.11 (2018), S. 3776–3784.
- [113] D. A. Calderwood, I. D. Campbell und D. R. Critchley. „Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion“. In: *Nature reviews Molecular cell biology* 14.8 (2013), S. 503–517.
- [114] B. Klapholz und N. H. Brown. „Talin—the master of integrin adhesions“. In: *J Cell Sci* 130.15 (2017), S. 2435–2446.
- [115] D. A. Calderwood. „Integrin activation“. In: *Journal of cell science* 117.5 (2004), S. 657–666.
- [116] R. Liddington und M. Ginsberg. „Integrin activation takes shape“. In: *The Journal of cell biology* 158.5 (2002), S. 833–839.
- [117] Y. Su, W. Xia, J. Li, T. Walz, M. J. Humphries, D. Vestweber, C. Cabanas, C. Lu und T. A. Springer. „Relating conformation to function in integrin $\alpha 5\beta 1$ “. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.27 (2016), E3872–E3881.
- [118] N. Miyazaki, K. Iwasaki und J. Takagi. „A systematic survey of conformational states in $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins using negative-stain electron microscopy“. In: *J Cell Sci* 131.10 (2018), jcs216754.
- [119] J. Wang, X. Dong, B. Zhao, J. Li, C. Lu und T. A. Springer. „Atypical interactions of integrin $\alpha V\beta 8$ with pro-TGF- $\beta 1$ “. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114.21 (2017), E4168–E4174.
- [120] J.-P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman und M. A. Arnaout. „Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha V\beta 3$ “. In: *Science* 294.5541 (2001), S. 339–345.
- [121] T. A. Springer und M. L. Dustin. „Integrin inside-out signaling and the immunological synapse“. In: *Current opinion in cell biology* 24.1 (2012), S. 107–115.
- [122] X. Dong, L.-Z. Mi, J. Zhu, W. Wang, P. Hu, B.-H. Luo und T. A. Springer. „ $\alpha V\beta 3$ integrin crystal structures and their functional implications“. In: *Biochemistry* 51.44 (2012), S. 8814–8828.
- [123] T. I. Moore, J. Aaron, T.-L. Chew und T. A. Springer. „Measuring integrin conformational change on the cell surface with super-resolution microscopy“. In: *Cell reports* 22.7 (2018), S. 1903–1912.
- [124] P. E. Hughes, F. Diaz-Gonzalez, L. Leong, C. Wu, J. A. McDonald, S. J. Shattil und M. H. Ginsberg. „Breaking the integrin hinge A defined structural constraint regulates integrin signaling“. In: *Journal of Biological Chemistry* 271.12 (1996), S. 6571–6574.
- [125] R. Briesewitz, A. Kern und E. E. Marcantonio. „Assembly and function of integrin receptors is dependent on opposing alpha and beta cytoplasmic domains.“ In: *Molecular Biology of the Cell* 6.8 (1995), S. 997–1010.
- [126] B. Wehrle-Haller. „Assembly and disassembly of cell matrix adhesions“. In: *Current opinion in cell biology* 24.5 (2012), S. 569–581.

-
- [127] M. A. Müller, L. Brunie, A.-S. Bächer, H. Kessler, K.-E. Gottschalk und U. Reuning. „Cytoplasmic salt bridge formation in integrin $\alpha v\beta 3$ stabilizes its inactive state affecting integrin-mediated cell biological effects“. In: *Cellular signalling* 26.11 (2014), S. 2493–2503.
- [128] J. Takagi und T. A. Springer. „Integrin activation and structural rearrangement“. In: *Immunological reviews* 186.1 (2002), S. 141–163.
- [129] J. Zhu, J. Zhu und T. A. Springer. „Complete integrin headpiece opening in eight steps“. In: *J Cell Biol* 201.7 (2013), S. 1053–1068.
- [130] Y. Yu, J. Zhu, L.-Z. Mi, T. Walz, H. Sun, J. Chen und T. A. Springer. „Structural specializations of $\alpha 4\beta 7$, an integrin that mediates rolling adhesion“. In: *J Cell Biol* 196.1 (2012), S. 131–146.
- [131] J. A. Askari, P. A. Buckley, A. P. Mould und M. J. Humphries. „Linking integrin conformation to function“. In: *Journal of cell science* 122.2 (2009), S. 165–170.
- [132] J. Takagi, B. M. Petre, T. Walz und T. A. Springer. „Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling“. In: *Cell* 110.5 (2002), S. 599–611.
- [133] B. H. Luo, C. V. Carman und T. A. Springer. „Structural basis of integrin regulation and signaling“. In: *Annual review of immunology* 25 (2007), S. 619.
- [134] J. Li, Y. Su, W. Xia, Y. Qin, M. J. Humphries, D. Vestweber, C. Cabañas, C. Lu und T. A. Springer. „Conformational equilibria and intrinsic affinities define integrin activation“. In: *The EMBO journal* 36.5 (2017), S. 629–645.
- [135] X. Dong, B. Zhao, F.-Y. Lin, C. Lu, B. N. Rogers und T. A. Springer. „High integrin $\alpha V\beta 6$ affinity reached by hybrid domain deletion slows ligand-binding on-rate“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.7 (2018), E1429–E1436.
- [136] J. Li und T. A. Springer. „Energy landscape differences among integrins establish the framework for understanding activation“. In: *J Cell Biol* 217.1 (2018), S. 397–412.
- [137] B. D. Adair, J.-P. Xiong, C. Maddock, S. L. Goodman, M. A. Arnaout und M. Yeager. „Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin $\alpha V\beta 3$ in a complex with fibronectin“. In: *The Journal of cell biology* 168.7 (2005), S. 1109–1118.
- [138] M. A. Arnaout, S. L. Goodman und J.-P. Xiong. „Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion“. In: *Current opinion in cell biology* 19.5 (2007), S. 495–507.
- [139] B. D. Adair, J.-P. Xiong, J. L. Alonso, B. T. Hyman und M. A. Arnaout. „EM structure of the ectodomain of integrin CD11b/CD18 and localization of its ligand-binding site relative to the plasma membrane“. In: *PloS one* 8.2 (2013), e57951.
- [140] D. Boettiger, L. Lynch, S. Blystone und F. Huber. „Distinct Ligand-binding Modes for Integrin $\alpha v\beta 3$ -Mediated Adhesion to Fibronectin versus Vitronectin“. In: *Journal of Biological Chemistry* 276.34 (2001), S. 31684–31690.
- [141] J. Li und T. A. Springer. „Integrin extension enables ultrasensitive regulation by cytoskeletal force“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114.18 (2017), S. 4685–4690.
- [142] M. Muguruma, S. Matsumura und T. Fukazawa. „Direct interactions between talin and actin“. In: *Biochemical and biophysical research communications* 171.3 (1990), S. 1217–1223.

- [143] D. Calderwood. *Talin controls integrin activation*. 2004.
- [144] N. J. Anthis, K. L. Wegener, F. Ye, C. Kim, B. T. Goult, E. D. Lowe, I. Vakonakis, N. Bate, D. R. Critchley, M. H. Ginsberg u. a. „The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction“. In: *The EMBO journal* 28.22 (2009), S. 3623–3632.
- [145] S. Tadokoro, S. J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R. C. Liddington, J. M. de Pereda, M. H. Ginsberg und D. A. Calderwood. „Talin binding to integrin β tails: a final common step in integrin activation“. In: *Science* 302.5642 (2003), S. 103–106.
- [146] M. Moser, K. R. Legate, R. Zent und R. Fässler. „The tail of integrins, talin, and kindlins“. In: *Science* 324.5929 (2009), S. 895–899.
- [147] C. Kim, F. Ye und M. H. Ginsberg. „Regulation of integrin activation“. In: *Annual review of cell and developmental biology* 27 (2011), S. 321–345.
- [148] F. Ye, G. Hu, D. Taylor, B. Ratnikov, A. A. Bobkov, M. A. McLean, S. G. Sligar, K. A. Taylor und M. H. Ginsberg. „Recreation of the terminal events in physiological integrin activation“. In: *The Journal of cell biology* 188.1 (2010), S. 157–173.
- [149] Y.-Q. Ma, J. Qin, C. Wu und E. F. Plow. „Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of $\beta 3$ integrins“. In: *The Journal of cell biology* 181.3 (2008), S. 439–446.
- [150] Z. Sun, M. Costell und R. Fässler. „Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces“. In: *Nature cell biology* 21.1 (2019), S. 25.
- [151] E. Puklin-Faucher, M. Gao, K. Schulten und V. Vogel. „How the headpiece hinge angle is opened: new insights into the dynamics of integrin activation“. In: *J Cell Biol* 175.2 (2006), S. 349–360.
- [152] X. Dong, B. Zhao, R. E. Jacob, J. Zhu, A. C. Koksai, C. Lu, J. R. Engen und T. A. Springer. „Force interacts with macromolecular structure in activation of TGF- β “. In: *Nature* 542.7639 (2017), S. 55.
- [153] J. Zhu, B.-H. Luo, T. Xiao, C. Zhang, N. Nishida und T. A. Springer. „Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces“. In: *Molecular cell* 32.6 (2008), S. 849–861.
- [154] P. Nordenfelt, H. L. Elliott und T. A. Springer. „Coordinated integrin activation by actin-dependent force during T-cell migration“. In: *Nature communications* 7 (2016), S. 13119.
- [155] J. C. Friedland, M. H. Lee und D. Boettiger. „Mechanically activated integrin switch controls $\alpha 5 \beta 1$ function“. In: *Science* 323.5914 (2009), S. 642–644.
- [156] A. C. Chang, A. H. Mekhdjian, M. Morimatsu, A. K. Denisin, B. L. Pruitt und A. R. Dunn. „Single molecule force measurements in living cells reveal a minimally tensioned integrin state“. In: *ACS nano* 10.12 (2016), S. 10745–10752.
- [157] A. d. Frelinger, S. Lam, E. F. Plow, M. A. Smith, J. C. Loftus und M. H. Ginsberg. „Occupancy of an adhesive glycoprotein receptor modulates expression of an antigenic site involved in cell adhesion.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 263.25 (1988), S. 12397–12402.
- [158] S. J. Shattil, C. Kim und M. H. Ginsberg. „The final steps of integrin activation: the end game“. In: *Nature reviews Molecular cell biology* 11.4 (2010), S. 288–300.
- [159] R. R. Hantgan, M. Rocco, C. Nagaswami und J. W. Weisel. „Binding of a fibrinogen mimetic stabilizes integrin $\alpha \text{IIb} \beta 3$'s open conformation“. In: *Protein Science* 10.8 (2001), S. 1614–1626.

- [160] B. Leitinger, A. McDowall, P. Stanley und N. Hogg. „The regulation of integrin function by Ca^{2+} “. In: *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1498.2-3 (2000), S. 91–98.
- [161] W. D. Staatz, S. M. Rajpara, E. A. Wayner, W. G. Carter und S. A. Santoro. „The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg^{++} -dependent adhesion of platelets to collagen.“ In: *The Journal of cell biology* 108.5 (1989), S. 1917–1924.
- [162] J. Gailit und E. Ruoslahti. „Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 263.26 (1988), S. 12927–12932.
- [163] M. Montero, M. Brini, R. Marsault, J. Alvarez, R. Sitia, T. Pozzan und R. Rizzuto. „Monitoring dynamic changes in free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells.“ In: *The EMBO journal* 14.22 (1995), S. 5467–5475.
- [164] P. Laurant und R. M. Touyz. „Physiological and pathophysiological role of magnesium in the cardiovascular system: implications in hypertension“. In: *Journal of hypertension* 18.9 (2000), S. 1177–1191.
- [165] J. W. Smith, R. S. Piotrowicz und D. Mathis. „A mechanism for divalent cation regulation of beta 3-integrins.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 269.2 (1994), S. 960–967.
- [166] J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman und M. A. Arnaout. „Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha\text{V}\beta 3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand“. In: *Science* 296.5565 (2002), S. 151–155.
- [167] M. M. Pesho, K. Bledzka, L. Michalec, C. S. Cierniewski und E. F. Plow. „The specificity and function of the metal-binding sites in the integrin $\beta 3$ A-domain“. In: *Journal of Biological Chemistry* 281.32 (2006), S. 23034–23041.
- [168] J. Chen, A. Salas und T. A. Springer. „Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster“. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 10.12 (2003), S. 995–1001.
- [169] T. Yanai, T. Shimo-Oka und I. Ii. „Manganese ion elicits a binding activity of placenta vitronectin receptor to fibronectin cell-binding domain“. In: *Cell structure and function* 16.2 (1991), S. 149–156.
- [170] O. Dormond, L. Ponsonnet, M. Hasmim, A. Foletti und C. Rüegg. „Manganese-induced integrin affinity maturation promotes recruitment of $\alpha\text{V}\beta 3$ integrin to focal adhesions in endothelial cells: Evidence for a role of phosphatidylinositol 3-kinase and Src“. In: *Thrombosis and haemostasis* 92.07 (2004), S. 151–161.
- [171] E. T. Eng, B. J. Smagghe, T. Walz und T. A. Springer. „Intact $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin is extended after activation as measured by solution x-ray scattering and electron microscopy“. In: *Journal of Biological Chemistry* 286.40 (2011), S. 35218–35226.
- [172] T. Kamata, M. Handa, Y. Sato, Y. Ikeda und S. Aiso. „Membrane-proximal α/β stalk interactions differentially regulate integrin activation“. In: *Journal of Biological Chemistry* 280.26 (2005), S. 24775–24783.
- [173] F. Ye, C. Kim und M. H. Ginsberg. „Reconstruction of integrin activation“. In: *Blood* 119.1 (2012), S. 26–33.
- [174] F. Ye, J. Liu, H. Winkler und K. A. Taylor. „Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ in a membrane environment remains the same height after Mn^{2+} activation when observed by cryoelectron tomography“. In: *Journal of molecular biology* 378.5 (2008), S. 976–986.

- [175] D. D. Hu, J. R. Hoyer und J. W. Smith. „Ca²⁺ suppresses cell adhesion to osteopontin by attenuating binding affinity for integrin $\alpha v\beta 3$ “. In: *Journal of Biological Chemistry* 270.17 (1995), S. 9917–9925.
- [176] D. Kirchhofer, J. Grzesiak und M. Pierschbacher. „Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 266.7 (1991), S. 4471–4477.
- [177] K. Zhang und J. Chen. „The regulation of integrin function by divalent cations“. In: *Cell adhesion & migration* 6.1 (2012), S. 20–29.
- [178] S. Tiwari, J. A. Askari, M. J. Humphries und N. J. Bulleid. „Divalent cations regulate the folding and activation status of integrins during their intracellular trafficking“. In: *J Cell Sci* 124.10 (2011), S. 1672–1680.
- [179] W. Xia und T. A. Springer. „Metal ion and ligand binding of integrin $\alpha 5\beta 1$ “. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.50 (2014), S. 17863–17868.
- [180] L. Levin, E. Zelzion, E. Nachliel, M. Gutman, Y. Tsfadia und Y. Einav. „A single disulfide bond disruption in the $\beta 3$ integrin subunit promotes thiol/disulfide exchange, a molecular dynamics study“. In: *PloS one* 8.3 (2013), e59175.
- [181] J. Calvete, A. Henschen und J. Gonzalez-Rodriguez. „Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the β -subunits of the integrin family“. In: *Biochemical Journal* 274.1 (1991), S. 63–71.
- [182] R. Mor-Cohen, N. Rosenberg, Y. Einav, E. Zelzion, M. Landau, W. Mansour, Y. Averbukh und U. Seligsohn. „Unique disulfide bonds in epidermal growth factor (EGF) domains of $\beta 3$ affect structure and function of $\alpha IIb\beta 3$ and $\alpha v\beta 3$ integrins in different manner“. In: *Journal of Biological Chemistry* 287.12 (2012), S. 8879–8891.
- [183] B. Edwards, M. Curry, E. Southon, A. Chong und L. J. Graf. „Evidence for a dithiol-activated signaling pathway in natural killer cell avidity regulation of leukocyte function antigen-1: structural requirements and relationship to phorbol ester-and CD16-triggered pathways“. In: *Blood* 86.6 (1995), S. 2288–2301.
- [184] K. Zhang, Y. Pan, J. Qi, J. Yue, M. Zhang, C. Xu, G. Li und J. Chen. „Disruption of disulfide-restriction at integrin knees induces activation and ligand-independent signaling of $\alpha 4\beta 7$ “. In: *J Cell Sci* (2013), jcs–134528.
- [185] G. E. Davis und C. W. Camarillo. „Regulation of integrin-mediated myeloid cell adhesion to fibronectin: influence of disulfide reducing agents, divalent cations and phorbol ester.“ In: *The Journal of Immunology* 151.12 (1993), S. 7138–7150.
- [186] H. Ni, A. Li, N. Simonsen und J. A. Wilkins. „Integrin Activation by Dithiothreitol or Mn²⁺ Induces a Ligand-occupied Conformation and Exposure of a Novel NH₂-terminal Regulatory Site on the $\beta 1$ Integrin Chain“. In: *Journal of Biological Chemistry* 273.14 (1998), S. 7981–7987.
- [187] B. Yan und J. W. Smith. „Mechanism of integrin activation by disulfide bond reduction“. In: *Biochemistry* 40.30 (2001), S. 8861–8867.
- [188] A. M. Ross, Z. Jiang, M. Bastmeyer und J. Lahann. „Physical aspects of cell culture substrates: topography, roughness, and elasticity“. In: *Small* 8.3 (2012), S. 336–355.
- [189] D. Lehnert, B. Wehrle-Haller, C. David, U. Weiland, C. Ballestrem, B. A. Imhof und M. Bastmeyer. „Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion“. In: *Journal of cell science* 117.1 (2004), S. 41–52.

-
- [190] S. Nemir und J. L. West. „Synthetic materials in the study of cell response to substrate rigidity“. In: *Annals of biomedical engineering* 38.1 (2010), S. 2–20.
- [191] M. Ahmed u. a. „Extracellular matrix regulation of stem cell behavior“. In: *Current stem cell reports* 2.3 (2016), S. 197–206.
- [192] R. G. Wells. „The role of matrix stiffness in regulating cell behavior“. In: *Hepatology* 47.4 (2008), S. 1394–1400.
- [193] D. Antoni, H. Burckel, E. Josset und G. Noel. „Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo“. In: *International journal of molecular sciences* 16.3 (2015), S. 5517–5527.
- [194] A. M. Greiner, B. Richter und M. Bastmeyer. „Micro-engineered 3D scaffolds for cell culture studies“. In: *Macromolecular bioscience* 12.10 (2012), S. 1301–1314.
- [195] C. A. DeForest und K. S. Anseth. „Advances in bioactive hydrogels to probe and direct cell fate“. In: *Annual review of chemical and biomolecular engineering* 3 (2012), S. 421–444.
- [196] B. Geiger und A. Bershadsky. „Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors“. In: *Cell* 110.2 (2002), S. 139–142.
- [197] E. Cukierman, R. Pankov und K. M. Yamada. „Cell interactions with three-dimensional matrices“. In: *Current opinion in cell biology* 14.5 (2002), S. 633–640.
- [198] J. A. Pedersen und M. A. Swartz. „Mechanobiology in the third dimension“. In: *Annals of biomedical engineering* 33.11 (2005), S. 1469–1490.
- [199] E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens und K. M. Yamada. „Taking cell-matrix adhesions to the third dimension“. In: *Science* 294.5547 (2001), S. 1708–1712.
- [200] J. R. Lange und B. Fabry. „Cell and tissue mechanics in cell migration“. In: *Experimental cell research* 319.16 (2013), S. 2418–2423.
- [201] K. L. Hui, L. Balagopalan, L. E. Samelson und A. Upadhyaya. „Cytoskeletal forces during signaling activation in Jurkat T-cells“. In: *Molecular biology of the cell* 26.4 (2015), S. 685–695.
- [202] C.-M. Lo, H.-B. Wang, M. Dembo und Y.-l. Wang. „Cell movement is guided by the rigidity of the substrate“. In: *Biophysical journal* 79.1 (2000), S. 144–152.
- [203] S. Wong, W.-H. Guo und Y.-L. Wang. „Fibroblasts probe substrate rigidity with filopodia extensions before occupying an area“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.48 (2014), S. 17176–17181.
- [204] G. Abrams, S. Goodman, P. Nealey, M. Franco und C. J. Murphy. „Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque“. In: *Cell and tissue research* 299.1 (2000), S. 39–46.
- [205] J. K. Kular, S. Basu und R. I. Sharma. „The extracellular matrix: structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering“. In: *Journal of tissue engineering* 5 (2014), S. 2041731414557112.
- [206] B. Geiger, J. P. Spatz und A. D. Bershadsky. „Environmental sensing through focal adhesions“. In: *Nature reviews Molecular cell biology* 10.1 (2009), S. 21.
- [207] D. E. Ingber. „Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction“. In: *Annual review of physiology* 59.1 (1997), S. 575–599.

- [208] R. S. Kane, S. Takayama, E. Ostuni, D. E. Ingber und G. M. Whitesides. „Patterning proteins and cells using soft lithography“. In: *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*. Elsevier, 1999, S. 161–174.
- [209] X. Zhou, F. Boey, F. Huo, L. Huang und H. Zhang. „Chemically functionalized surface patterning“. In: *Small* 7.16 (2011), S. 2273–2289.
- [210] D. Falconnet, G. Csucs, H. M. Grandin und M. Textor. „Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays“. In: *Biomaterials* 27.16 (2006), S. 3044–3063.
- [211] N. Xia, C. K. Thodeti, T. P. Hunt, Q. Xu, M. Ho, G. M. Whitesides, R. Westervelt und D. E. Ingber. „Directional control of cell motility through focal adhesion positioning and spatial control of Rac activation“. In: *The FASEB journal* 22.6 (2008), S. 1649–1659.
- [212] K. Yokoyama, X.-P. Zhang, L. Medved und Y. Takada. „Specific binding of integrin $\alpha\beta3$ to the fibrinogen γ and αE chain C-terminal domains“. In: *Biochemistry* 38.18 (1999), S. 5872–5877.
- [213] A. Miyauchi, J. Alvarez, E. Greenfield, A. Teti, M. Grano, S. Colucci, A. Zambonin-Zallone, F. Ross, S. Teitelbaum und D. Cheresch. „Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 266.30 (1991), S. 20369–20374.
- [214] A. Miyauchi, J. Alvarez, E. Greenfield, A. Teti, M. Grano, S. Colucci, A. Zambonin-Zallone, F. Ross, S. Teitelbaum, D. Cheresch u. a. „Binding of osteopontin to the osteoclast integrin $\alpha v \beta 3$ “. In: *Osteoporosis International* 3.1 (1993), S. 132–135.
- [215] J. Lawler und R. O. Hynes. „An integrin receptor on normal and thrombasthenic platelets that binds thrombospondin [see comments]“. In: *Blood* 74.6 (1989), S. 2022–2027.
- [216] P. Pinon, J. Pärssinen, P. Vazquez, M. Bachmann, R. Rahikainen, M.-C. Jacquier, L. Azizi, J. A. Määttä, M. Bastmeyer, V. P. Hytönen u. a. „Talin-bound NPLY motif recruits integrin-signaling adapters to regulate cell spreading and mechanosensing“. In: *The Journal of cell biology* 205.2 (2014), S. 265–281.
- [217] M. Schäfer. „Lokalisation von beta3-Integrin auf differenziellen Fibronektin/Vitronektin Substraten nach allosterischer Aktivierung und Manipulation des Turnovers. Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften. Zoologisches Institut, Zell- und Neurobiologie. Karlsruhe Institut für Technologie (KIT)“. In: (2015).
- [218] K. Weißenbruch. „Differenzielle Lokalisation von alphaVbeta3-Integrin auf mikrostrukturierten Fibronektin/Vitronektin Substraten. Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften. Zoologisches Institut, Zell- und Neurobiologie. Karlsruhe Institut für Technologie (KIT)“. In: (2015).
- [219] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold und M. Danielsen. „Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84.21 (1987), S. 7413–7417.
- [220] N. B. Shah und T. M. Duncan. „Bio-layer interferometry for measuring kinetics of protein-protein interactions and allosteric ligand effects“. In: *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 84 (2014), e51383.

- [221] Y. Abdiche, D. Malashock, A. Pinkerton und J. Pons. „Determining kinetics and affinities of protein interactions using a parallel real-time label-free biosensor, the Octet“. In: *Analytical biochemistry* 377.2 (2008), S. 209–217.
- [222] C. Cremer, R. Kaufmann, M. Gunkel, S. Pres, Y. Weiland, P. Müller, T. Ruckelshausen, P. Lemmer, F. Geiger, S. Degenhard u. a. „Superresolution imaging of biological nanostructures by spectral precision distance microscopy“. In: *Biotechnology journal* 6.9 (2011), S. 1037–1051.
- [223] Y. Hirano, A. Matsuda und Y. Hiraoka. „Recent advancements in structured-illumination microscopy toward live-cell imaging“. In: *Microscopy* (2015), dfv034.
- [224] J. R. Allen, S. T. Ross und M. W. Davidson. „Structured illumination microscopy for superresolution“. In: *ChemPhysChem* 15.4 (2014), S. 566–576.
- [225] M. G. Gustafsson, L. Shao, P. M. Carlton, C. R. Wang, I. N. Golubovskaya, W. Z. Cande, D. A. Agard und J. W. Sedat. „Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination“. In: *Biophysical journal* 94.12 (2008), S. 4957–4970.
- [226] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid u. a. „Fiji: an open-source platform for biological-image analysis“. In: *Nature methods* 9.7 (2012), S. 676.
- [227] E. Manders, F. Verbeek und J. Aten. „Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images“. In: *Journal of microscopy* 169.3 (1993), S. 375–382.
- [228] S. V. Costes, D. Daelemans, E. H. Cho, Z. Dobbin, G. Pavlakis und S. Lockett. „Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells“. In: *Biophysical journal* 86.6 (2004), S. 3993–4003.
- [229] E. G. Hayman, M. D. Pierschbacher, S. Suzuki und E. Ruoslahti. „Vitronectin—a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum“. In: *Experimental cell research* 160.2 (1985), S. 245–258.
- [230] R. Rahikainen, M. von Essen, M. Schaefer, L. Qi, L. Azizi, C. Kelly, T. O. Ihalainen, B. Wehrle-Haller, M. Bastmeyer, C. Huang u. a. „Mechanical stability of talin rod controls cell migration and substrate sensing“. In: *Scientific reports* 7.1 (2017), S. 3571.
- [231] M. Kovács, J. Tóth, C. Hetényi, A. Málnási-Csizmadia und J. R. Sellers. „Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II“. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.34 (2004), S. 35557–35563.
- [232] J. D. Humphries, P. Wang, C. Streuli, B. Geiger, M. J. Humphries und C. Ballestrem. „Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin“. In: *The Journal of cell biology* 179.5 (2007), S. 1043–1057.
- [233] D. W. Dumbauld, T. T. Lee, A. Singh, J. Scrimgeour, C. A. Gersbach, E. A. Zamir, J. Fu, C. S. Chen, J. E. Curtis, S. W. Craig u. a. „How vinculin regulates force transmission“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.24 (2013), S. 9788–9793.
- [234] C. T. Mierke, P. Kollmannsberger, D. P. Zitterbart, G. Diez, T. M. Koch, S. Marg, W. H. Ziegler, W. H. Goldmann und B. Fabry. „Vinculin facilitates cell invasion into 3D collagen matrices“. In: *Journal of Biological Chemistry* (2010), jbc–M109.
- [235] V. Auernheimer, L. A. Lautscham, M. Leidenberger, O. Friedrich, B. Kappes, B. Fabry und W. H. Goldmann. „Vinculin phosphorylation at residues Y100 and Y1065 is required for cellular force transmission“. In: *J Cell Sci* (2015), jcs–172031.

- [236] A. Rahman, S. P. Carey, C. M. Kraning-Rush, Z. E. Goldblatt, F. Bordeleau, M. C. Lampi, D. Y. Lin, A. J. Garcia und C. A. Reinhart-King. „Vinculin regulates directionality and cell polarity in two- and three-dimensional matrix and three-dimensional microtrack migration“. In: *Molecular biology of the cell* 27.9 (2016), S. 1431–1441.
- [237] C. Cluzel, F. Saltel, J. Lussi, F. Paulhe, B. A. Imhof und B. Wehrle-Haller. „The mechanisms and dynamics of $\alpha\beta3$ integrin clustering in living cells“. In: *The Journal of cell biology* 171.2 (2005), S. 383–392.
- [238] B. Sjöblom, A. Salmazo und K. Djinović-Carugo. „ α -Actinin structure and regulation“. In: *Cellular and molecular life sciences* 65.17 (2008), S. 2688.
- [239] P. Roca-Cusachs, A. Del Rio, E. Puklin-Faucher, N. C. Gauthier, N. Biais und M. P. Sheetz. „Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by α -actinin triggers adhesion maturation“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2013), S. 201220723.
- [240] B. Kovac, J. L. Teo, T. P. Mäkelä und T. Vallenius. „Assembly of non-contractile dorsal stress fibers requires α -actinin-1 and Rac1 in migrating and spreading cells“. In: *J Cell Sci* 126.1 (2013), S. 263–273.
- [241] Y. Cai, N. Biais, G. Giannone, M. Tanase, G. Jiang, J. M. Hofman, C. H. Wiggins, P. Silberzan, A. Buguin, B. Ladoux u. a. „Nonmuscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow“. In: *Biophysical journal* 91.10 (2006), S. 3907–3920.
- [242] M. H. Jorrich, W. Shih und S. Yamada. „Myosin IIA deficient cells migrate efficiently despite reduced traction forces at cell periphery“. In: *Biology open* 2.4 (2013), S. 368–372.
- [243] V. P. Hytönen und B. Wehrle-Haller. „Mechanosensing in cell–matrix adhesions–Converting tension into chemical signals“. In: *Experimental cell research* 343.1 (2016), S. 35–41.
- [244] J. C. Kuo. „Mechanotransduction at focal adhesions: integrating cytoskeletal mechanics in migrating cells“. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 17.6 (2013), S. 704–712.
- [245] B. H. Luo, T. A. Springer und J. Takagi. „Stabilizing the open conformation of the integrin headpiece with a glycan wedge increases affinity for ligand“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.5 (2003), S. 2403–2408.
- [246] G. Bazzoni, L. Ma, M.-L. Blue und M. E. Hemler. „Divalent cations and ligands induce conformational changes that are highly divergent among $\beta1$ integrins“. In: *Journal of Biological Chemistry* 273.12 (1998), S. 6670–6678.
- [247] F. Schaffner, A. Ray und M. Dontenwill. „Integrin $\alpha5\beta1$, the fibronectin receptor, as a pertinent therapeutic target in solid tumors“. In: *Cancers* 5.1 (2013), S. 27–47.
- [248] J. S. Bennett. „Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3“. In: *The Journal of clinical investigation* 115.12 (2005), S. 3363–3369.
- [249] D. A. Lauffenburger und A. F. Horwitz. „Cell migration: a physically integrated molecular process“. In: *Cell* 84.3 (1996), S. 359–369.
- [250] E. G. Hayman, M. D. Pierschbacher, Y. Ohgren und E. Ruoslahti. „Serum spreading factor (vitronectin) is present at the cell surface and in tissues“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80.13 (1983), S. 4003–4007.

- [251] A. Yaghoubi, M. Ghojzadeh, S. Abolhasani, H. Alikhah und F. Khaki-Khatibi. „Correlation of serum levels of vitronectin, malondialdehyde and Hs-CRP with disease severity in coronary artery disease“. In: *Journal of cardiovascular and thoracic research* 7.3 (2015), S. 113.
- [252] G. C. Alghisi, L. Ponsonnet und C. Rüegg. „The integrin antagonist cilengitide activates $\alpha V\beta 3$, disrupts VE-cadherin localization at cell junctions and enhances permeability in endothelial cells“. In: *PloS one* 4.2 (2009), e4449.
- [253] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman und H. Kessler. „N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective $\alpha v\beta 3$ integrin antagonists“. In: *Journal of medicinal chemistry* 42.16 (1999), S. 3033–3040.
- [254] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. Timpl und J. Engel. „Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha IIb beta 3, alpha V beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 269.32 (1994), S. 20233–20238.
- [255] Y.-L. Wang. „Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling.“ In: *The Journal of cell biology* 101.2 (1985), S. 597–602.
- [256] W. C. Salmon, M. C. Adams und C. M. Waterman-Storer. „Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells“. In: *The Journal of cell biology* 158.1 (2002), S. 31–37.
- [257] M. L. Gardel, B. Sabass, L. Ji, G. Danuser, U. S. Schwarz und C. M. Waterman. „Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed“. In: *The Journal of cell biology* 183.6 (2008), S. 999–1005.
- [258] S. Yamashiro und N. Watanabe. „A new link between the retrograde actin flow and focal adhesions“. In: *The Journal of Biochemistry* 156.5 (2014), S. 239–248.
- [259] P. Kanchanawong, G. Shtengel, A. M. Pasapera, E. B. Ramko, M. W. Davidson, H. F. Hess und C. M. Waterman. „Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions“. In: *Nature* 468.7323 (2010), S. 580–584.
- [260] A. F. Straight, A. Cheung, J. Limouze, I. Chen, N. J. Westwood, J. R. Sellers und T. J. Mitchison. „Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor“. In: *Science* 299.5613 (2003), S. 1743–1747.
- [261] A. Elosegui-Artola, R. Oria, Y. Chen, A. Kosmalska, C. Pérez-González, N. Castro, C. Zhu, X. Trepast und P. Roca-Cusachs. „Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity“. In: *Nature cell biology* 18.5 (2016), S. 540.
- [262] I. Thievensen, P. M. Thompson, S. Berlemont, K. M. Plevock, S. V. Plotnikov, A. Zemljic-Harpf, R. S. Ross, M. W. Davidson, G. Danuser, S. L. Campbell u. a. „Vinculin–actin interaction couples actin retrograde flow to focal adhesions, but is dispensable for focal adhesion growth“. In: *J Cell Biol* 202.1 (2013), S. 163–177.
- [263] J. R. Beach, K. S. Bruun, L. Shao, D. Li, Z. Swider, K. Remmert, Y. Zhang, M. A. Conti, R. S. Adelstein, N. M. Rusan u. a. „Actin dynamics and competition for myosin monomer govern the sequential amplification of myosin filaments“. In: *Nature cell biology* 19.2 (2017), S. 85.
- [264] R. W. Style, R. Boltianskiy, G. K. German, C. Hyland, C. W. MacMinn, A. F. Mertz, L. A. Wilen, Y. Xu und E. R. Dufresne. „Traction force microscopy in physics and biology“. In: *Soft matter* 10.23 (2014), S. 4047–4055.

- [265] Y. Bustanji und B. Samori. „The Mechanical Properties of Human Angiostatin Can Be Modulated by Means of Its Disulfide Bonds: A Single-Molecule Force-Spectroscopy Study“. In: *Angewandte Chemie International Edition* 41.9 (2002), S. 1546–1548.
- [266] A. P. Wiita, S. R. K. Ainarapu, H. H. Huang und J. M. Fernandez. „Force-dependent chemical kinetics of disulfide bond reduction observed with single-molecule techniques“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.19 (2006), S. 7222–7227.
- [267] N. Bhasin, P. Carl, S. Harper, G. Feng, H. Lu, D. W. Speicher und D. E. Discher. „Chemistry on a single protein, vascular cell adhesion molecule-1, during forced unfolding“. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.44 (2004), S. 45865–45874.
- [268] P. Carl, C. H. Kwok, G. Manderson, D. W. Speicher und D. E. Discher. „Forced unfolding modulated by disulfide bonds in the Ig domains of a cell adhesion molecule“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98.4 (2001), S. 1565–1570.
- [269] F. Kong, A. J. Garcia, A. P. Mould, M. J. Humphries und C. Zhu. „Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand“. In: *The Journal of cell biology* 185.7 (2009), S. 1275–1284.
- [270] J. Zhu, B. Boylan, B.-H. Luo, P. J. Newman und T. A. Springer. „Tests of the extension and deadbolt models of integrin activation“. In: *Journal of Biological Chemistry* 282.16 (2007), S. 11914–11920.
- [271] Z. Fan, S. McArdle, A. Marki, Z. Mikulski, E. Gutierrez, B. Engelhardt, U. Deutsch, M. Ginsberg, A. Groisman und K. Ley. „Neutrophil recruitment limited by high-affinity bent β 2 integrin binding ligand in cis“. In: *Nature communications* 7 (2016), S. 12658.
- [272] S. Wang, C. Wu, Y. Zhang, Q. Zhong, H. Sun, W. Cao, G. Ge, G. Li, X. F. Zhang und J. Chen. „Integrin α 4 β 7 switches its ligand specificity via distinct conformer-specific activation“. In: *J Cell Biol* 217.8 (2018), S. 2799–2812.
- [273] J. W. Smith und D. A. Cheresh. „Integrin (alpha v beta 3)-ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 265.4 (1990), S. 2168–2172.
- [274] Y. Yokosaki, K. Tanaka, F. Higashikawa, K. Yamashita und A. Eboshida. „Distinct structural requirements for binding of the integrins α v β 6, α v β 3, α v β 5, α 5 β 1 and α 9 β 1 to osteopontin“. In: *Matrix biology* 24.6 (2005), S. 418–427.
- [275] A. Cormier, M. G. Campbell, S. Ito, S. Wu, J. Lou, J. Marks, J. L. Baron, S. L. Nishimura und Y. Cheng. „Cryo-EM structure of the α v β 8 integrin reveals a mechanism for stabilizing integrin extension“. In: *Nature structural & molecular biology* 25.8 (2018), S. 698.
- [276] M. Nagae, S. Re, E. Mihara, T. Nogi, Y. Sugita und J. Takagi. „Crystal structure of α 5 β 1 integrin ectodomain: Atomic details of the fibronectin receptor“. In: *J Cell Biol* 197.1 (2012), S. 131–140.
- [277] M. Benito-Jardón, S. Klapproth, I. Gimeno-LLuch, T. Petzold, M. Bharadwaj, D. J. Müller, G. Zuchtriegel, C. A. Reichel und M. Costell. „The fibronectin synergy site re-enforces cell adhesion and mediates a crosstalk between integrin classes“. In: *Elife* 6 (2017), e22264.
- [278] R. Li, P. Rieu, D. L. Griffith, D. Scott und M. A. Arnaout. „Two functional states of the CD11b A-domain: correlations with key features of two Mn²⁺-complexed crystal structures“. In: *The Journal of cell biology* 143.6 (1998), S. 1523–1534.

- [279] B.-H. Luo und T. A. Springer. „Integrin structures and conformational signaling“. In: *Current opinion in cell biology* 18.5 (2006), S. 579–586.
- [280] R. Soldi, S. Mitola, M. Strasly, P. Defilippi, G. Tarone und F. Bussolino. „Role of $\alpha v \beta 3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2“. In: *The EMBO journal* 18.4 (1999), S. 882–892.
- [281] J. S. Desgrosellier und D. A. Cheresh. „Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities“. In: *Nature Reviews Cancer* 10.1 (2010), S. 9.
- [282] M.-Y. Hsu, D.-T. Shih, F. E. Meier, P. Van Belle, J.-Y. Hsu, D. E. Elder, C. A. Buck und M. Herlyn. „Adenoviral gene transfer of $\beta 3$ integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma“. In: *The American journal of pathology* 153.5 (1998), S. 1435–1442.
- [283] S. Havaki, M. Kouloukoussa, K. Amawi, Y. Drosos, L. D. Arvanitis, N. Goutas, D. Vlachodimitropoulos, S. D. Vassilaros, E. Z. Katsantoni, I. Voloudakis-Baltatzis u. a. „Altered expression pattern of integrin $\alpha v \beta 3$ correlates with actin cytoskeleton in primary cultures of human breast cancer“. In: *Cancer Cell International* 7.1 (2007), S. 16.
- [284] P. C. Brooks, R. A. Clark und D. A. Cheresh. „Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis“. In: *Science* 264.5158 (1994), S. 569–571.
- [285] P. C. Brooks, S. Stromblad, R. Klemke, D. Visscher, F. H. Sarkar und D. A. Cheresh. „Antiintegrin $\alpha v \beta 3$ blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin.“ In: *The Journal of clinical investigation* 96.4 (1995), S. 1815–1822.
- [286] E. Geissinger, C. Weisser, P. Fischer, M. Scharl und C. Wellbrock. „Autocrine stimulation by osteopontin contributes to antiapoptotic signalling of melanocytes in dermal collagen“. In: *Cancer research* 62.16 (2002), S. 4820–4828.
- [287] E. Zamir, M. Katz, Y. Posen, N. Erez, K. M. Yamada, B.-Z. Katz, S. Lin, D. C. Lin, A. Bershadsky, Z. Kam u. a. „Dynamics and segregation of cell–matrix adhesions in cultured fibroblasts“. In: *Nature cell biology* 2.4 (2000), S. 191.
- [288] Z. Sun, H.-Y. Tseng, S. Tan, F. Senger, L. Kurzawa, D. Dedden, N. Mizuno, A. A. Wasik, M. Thery, A. R. Dunn u. a. „Kank2 activates talin, reduces force transduction across integrins and induces central adhesion formation“. In: *Nature cell biology* 18.9 (2016), S. 941.
- [289] B.-Z. Katz, E. Zamir, A. Bershadsky, Z. Kam, K. M. Yamada und B. Geiger. „Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions“. In: *Molecular biology of the cell* 11.3 (2000), S. 1047–1060.
- [290] E. Zamir, B.-Z. Katz, S.-i. Aota, K. M. Yamada, B. Geiger und Z. Kam. „Molecular diversity of cell-matrix adhesions“. In: *Journal of cell science* 112.11 (1999), S. 1655–1669.
- [291] K. Burridge und K. Fath. „Focal contacts: transmembrane links between the extracellular matrix and the cytoskeleton“. In: *Bioessays* 10.4 (1989), S. 104–108.
- [292] N. M. Kronenberg, P. Liehm, A. Steude, J. A. Knipper, J. G. Borger, G. Scarcelli, K. Franze, S. J. Powis und M. C. Gather. „Long-term imaging of cellular forces with high precision by elastic resonator interference stress microscopy“. In: *Nature cell biology* 19.7 (2017), S. 864.
- [293] N.-P. Chen, Z. Sun und R. Fässler. „The Kank family proteins in adhesion dynamics“. In: *Current opinion in cell biology* 54 (2018), S. 130–136.